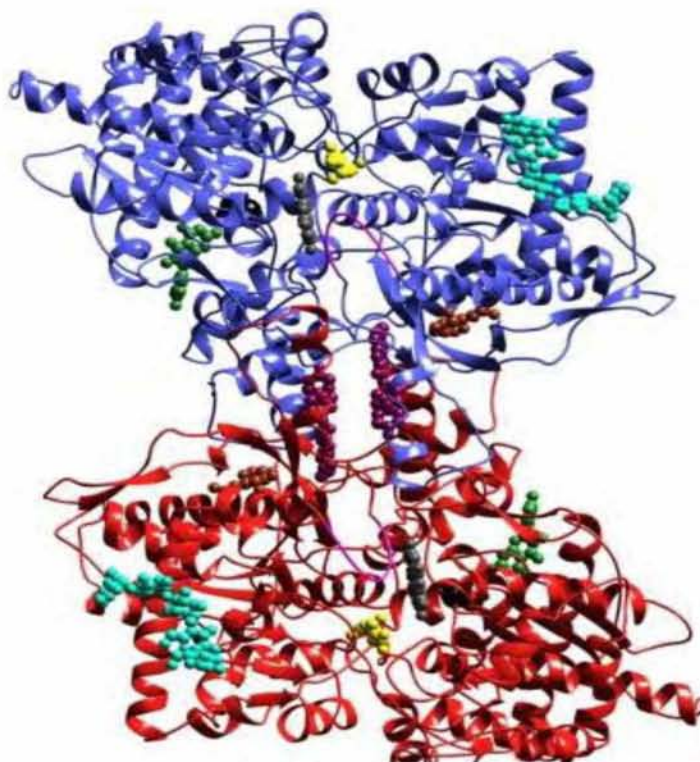




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



**Βιολογική αποτίμηση της δράσης αναστολέων της
φωσφορυλάσης του γλυκογόνου(GP) σε ex vivo σύστημα
καρκινικών κυττάρων ήπατος HepG2**



ΟΝΟΜΑ: ΚΑΤΣΙΔΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

Διπλωματική εργασία

Βιολογική αποτίμηση της δράσης αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου(GP) σε ex vivo σύστημα καρκινικών κυττάρων ήπατος HepG2

Biological evaluation of glycogen phosphorylase(GP) inhibitors in an ex vivo HepG2 liver cancer cell system

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ :

- ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ

Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΕΩΝΙΔΑΣ

Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract	6
1.Μεταβολισμός του γλυκογόνου	8
1.1 Γενικά στοιχεία.....	8
1.2 Σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου	9
1.3 Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου	11
2. Διαταραχές του μεταβολισμού του γλυκογόνου.....	12
2.1 Γλυκογονιάσεις.....	12
2.2 Σακχαρώδης Διαβήτης	14
2.2.1Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I	14
2.2.2Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II	15
3.Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	16
3.1 Γενικά στοιχεία.....	16
3.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου	17
3.3Αλλοστερική ρύθμιση της φωσφορυλάσης.....	18
3.3.1Μυϊκή φωσφορυλάση.....	19
3.3.2Ηπατική φωσφορυλάση.....	20
3.4 Δομή του ενζύμου	22
3.5Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	25
3.6 Σχεδιασμός φαρμάκων.....	26
4.Σκοπός	27
5.Υλικά και μέθοδοι	28
5.1 Οργανολογία:	28
5.2Υλικά:.....	28
5.3Αναλώσιμα	29
5.4 Κύτταρα HepG2	29
5.4.1Συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων HepG2	30
5.5Τεχνικές κυτταροκαλλιιεργειών	31
5.5.1 Ξεπάγωμα κυττάρων	31
5.5.2 Θρυψινοποίηση κυττάρων.....	32
5.5.3 Ψύξη κυττάρων	33
5.5.4 Μέτρηση κυττάρων HepG2 με πλάκα Neubauer	33

5.6 Προετοιμασία κυττάρων για το πείραμα ελέγχου δραστικότητας του ενζύμου GPb...	34
5.7 Ενζυμικός προσδιορισμός δραστικότητας GPb.....	35
5.7.1 Εκτίμηση βέλτιστης ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος	36
5.7.2 Μελέτες σε αναστολείς	36
5.7.3 Προσδιορισμός IC50 αναστολέων.....	38
5.7.4 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφορικών ιόντων	39
5.7.5 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford	39
5.7.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων	41
6. Αποτελέσματα-Συζήτηση	43
6.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τη μέθοδο Bradford.....	43
6.2 Μελέτη αναστολέων	44
6.3 Προσδιορισμός IC50 αναστολέων	44
Παράρτημα.....	48
1. Μελέτη πρόσδεσης αναστολέων	48
2. Διαλύματα	50
Βιβλιογραφία	51

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2018-Ιούνιος 2018, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Σκαμνάκη Βασιλική, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση αυτού του θέματος, για την υπομονή της αλλά και για τις συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην επίκουρο καθηγήτρια κ. Ψαρρά Άννα Μαρία για την επιστημονική γνώση και την καθοδήγηση που μου προσέφερε σε ότι αφορά τον τομέα των κυτταροκαλλιεργειών αλλά και τον Καθηγητή Δημήτρη Λεωνίδα για τη βοήθειά και την συνεργασία του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας που με βοήθησαν να προσαρμοστώ στις απαιτητικές συνθήκες του εργαστηρίου. Συγκεκριμένα ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Σολοβού Θεοδώρα που ήταν πάντα πρόθυμη να απαντήσει σε κάθε ερώτησή μου και τους υποψήφιους διδάκτορες Γεώργιο Στραβοδήμο και Ευθύμιο Κυριάκη. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν και η βοήθεια της υποψήφιας διδάκτορα Καρρά Κατερίνας για τις συμβουλές και τη βοήθεια της ώστε να κατανοήσω πλήρως τις τεχνικές των κυτταροκαλλιεργειών. Επίσης ευχαριστήσω θερμά τους προπτυχιακούς φοιτητές και φίλους μου Κατούνη Δημήτρη και Πολίτη Ελένη για τις όμορφες στιγμές μας στο εργαστήριο ,την άψογη συμπεριφορά τους και για την στήριξη τους.

Τέλος δε μπορώ να μην αναφερθώ στην οικογένεια μου για τη συμπαράσταση και την εμπύχωση που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια και τους ευχαριστώ ιδιαίτερα για αυτό.

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί μια από τις σοβαρότερες μεταβολικές και ορμονικές διαταραχές που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) αλλά και από διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Είναι αποτέλεσμα είτε της ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε της ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Με σκοπό τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, τα διάφορα ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τον κατευθυνόμενο σχεδιασμό ενώσεων με σκοπό την χρησιμοποίησή τους ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, καθώς καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του αποδίδοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. Μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό τέτοιων φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε αρχικά η ανασταλτική ισχύς σε κυτταρικό επίπεδο 4 ενώσεων στην ενζυμική δραστηριότητα της GP με κινητικά πειράματα (δοκιμές σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2). Ακολούθησε προσδιορισμός της IC₅₀ για τους 2 αναστολείς που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Ο αναστολέας Szk 377 έδειξε να αναστέλλει το ένζυμο με IC₅₀=176,7834 ±1,7μM ενώ ο BC1-11 με IC₅₀= 70,0367 ±2,5μM. Οι αναστολείς που δοκιμάστηκαν είναι συνθετικά μόρια τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς σε *in vitro* πειράματα.

Abstract

Diabetes mellitus(DM) is one of the most serious hormonal and metabolic imbalance diseases which is characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance, either as a result of decreased insulin secretion or because of decrease in body cells sensitivity to insulin. With the aim of treating this pathological state, enzymes and substrates involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets for the rational structure-based design of potential hypoglycaemic drugs. Glycogen phosphorylase (GP) is a key enzyme involved in glycogen metabolism by catalyzing the first step of glycogen breakdown towards glucose-1-phosphate (G1P).Hepatic glycogen phosphorylase is considered to be one of the most promising therapeutic targets for the design of these drugs.

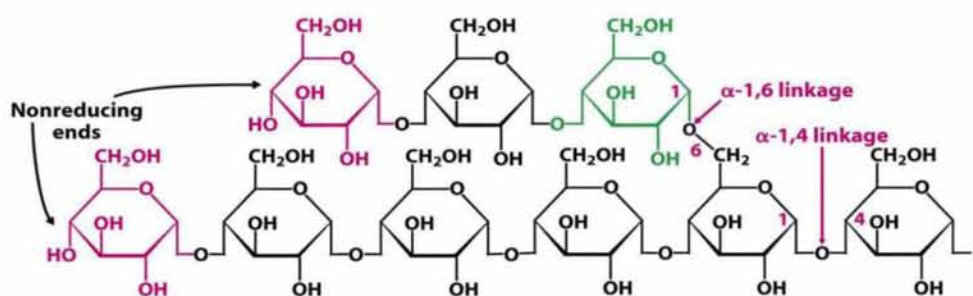
In this report, we studied the inhibitory ability of 4 compounds on the enzymatic activity of GP in ex vivo experiments (trials in HepG2 human liver carcinoma cell line).

Then, we measured the IC_{50} of the two inhibitors that had the best result. Inhibitor SzK 377 inhibited the enzyme with an $IC_{50}=176,7834 \pm 1,7\mu M$ and inhibitor BC1-11 with an $IC_{50}= 70,0367 \pm 2,5\mu M$. The inhibitors which were tested are synthetic compounds that have been studied *in vitro* experiments.

1.Μεταβολισμός του γλυκογόνου

1.1 Γενικά στοιχεία

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης το οποίο χρησιμεύει ως ένα ωσμωτικά ουδέτερο μέσο για την αποθήκευση της γλυκόζης σε κύτταρα σε περιόδους θρεπτικής αφθονίας και για χρήση σε περιόδους ανάγκης. Η ανακάλυψη του γλυκογόνου στο ήπαρ το 1857 αποδίδεται στον Claude Bernard .Το γλυκογόνο υπάρχει σε πολλούς οργανισμούς, από τα βακτήρια και τα αρχαία, έως και τον άνθρωπο. Τα φυτά συνθέτουν συναφή πολυμερή γλυκόζης με τη μορφή αμύλου που αποτελείται από αμυλοπεκτίνη, έναν πολυσακχαρίτη χημικώς παρόμοιο με το γλυκογόνο και αμυλόζη, που είναι ένα ουσιαστικά μη διακλαδισμένο γραμμικό πολυμερές γλυκόζης. Επομένως, ο πολυμερισμός της γλυκόζης μπορεί να είναι ένας καθολικός μηχανισμός αποθήκευσης ενέργειας στη φύση. (Roach et al., 2012)

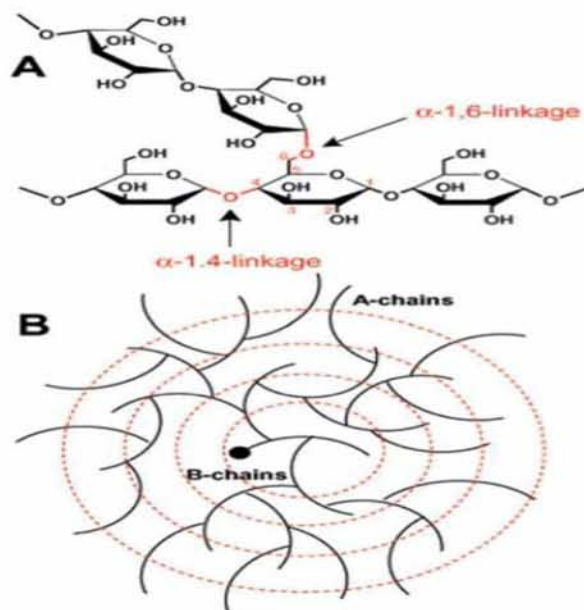


Εικόνα 1:δομή του γλυκογόνου(Stryer L. et al., 2012)

Ένα μόριο γλυκογόνου έχει κατά προσέγγιση 12 στιβάδες μορίων γλυκόζης και μπορεί να φτάσει σε μέγεθος τα 40nm. Οι αλυσίδες του είναι δομημένες από γλυκόζη, που συνδέονται με α -1,4 δεσμό και φέρουν ανά 8 η 12 μόρια γλυκόζης μια διακλάδωση με α -1,6 δεσμό. Η σχετική μοριακή μάζα του δείχνει εξαιρετική ποικιλία και κυμαίνεται μεταξύ 10^5 και 10^7 . Ένα καλά αποδεκτό μοντέλο για τη δομή του γλυκογόνου κατηγοριοποιεί τις αλυσίδες ως εσωτερικές Β-αλυσίδες, οι οποίες περιέχουν συνήθως δύο διακλαδώσεις, και ως εξωτερικές Α-αλυσίδες, οι οποίες είναι μη διακλαδισμένες. (Roach et al., 2012)

Οι δυο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου στον οργανισμό είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Το γλυκογόνο έχει ταυτοποιηθεί και σε άλλους ιστούς όπως ο εγκέφαλος,ο λιπώδης ιστός και τα ερυθροκύτταρα αλλά η λειτουργία του σε αυτούς τους ιστούς είναι ως επί το πλείστον άγνωστη. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ σε σχέση με του μύες (10% w/w και 2% w/w αντίστοιχα) αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύς συνολικά, λόγω της μεγαλύτερης μάζας τους. Το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων με τη μορφή κοκκίων. Στους σκελετικούς μύς, τα κοκκία που περιέχουν

γλυκογόνο έχουν διάμετρο 10-44 nm, ενώ στο ήπαρ περίπου 110-290 nm. Το γλυκογόνο μέσα στα κύτταρα μπορεί να προσδιοριστεί με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Στο ήπαρ η σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού. Αντίθετα, στους μυς οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο. (Stryer L. et al., 2012) (Adeva-Andany, González-Lucán, Donapetry-García, Fernández-Fernández, & Ameneiros-Rodríguez, 2016)



Εικόνα 2: Α. Παρατηρούνται οι α -1,4 και α -1,6-γλυκοζιτικοί δεσμοί. (Β) Η οργάνωση του γλυκογόνου σε εσωτερικές β αλυσίδες που φέρουν κατά μέσο όρο δύο διακλαδώσεις και εξωτερικές α -αλυσίδες χωρίς διακλαδώσεις. Η μαύρη κουκίδα δηλώνει τη θέση της γλυκογονίνης. (Roach et al., 2012)

1.2 Σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου εκτελείται στο κυτταρόπλασμα από εξωκυτταρική γλυκόζη που μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα μέσω μεταφορέων γλυκόζης (GLUTs) ή από μια έμμεση οδό όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν γαλακτικό και αμινοξέα. Η συνθάση του γλυκογόνου μπορεί να προσθέσει κατάλοιπα γλυκόζης μόνο εάν η πολυσακχαριτική αλυσίδα περιέχει ήδη περισσότερα από 4 κατάλοιπα. Έτσι η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται έναν εκκινητή. Το πρώτο στάδιο επομένως της σύνθεσης γλυκογόνου συνίσταται στην αυτογλυκοσυλίωση της γλυκογενίνης, η οποία παρέχει τον εναρκτήριο ολιγοσακχαριτών. (Stryer L. et al., 2012) (Zois & Harris, 2016)

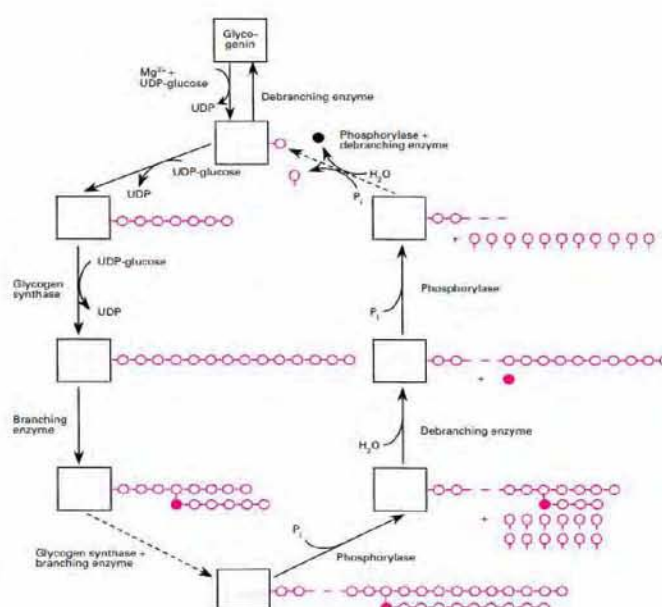
Σε αυτόν τον εκκινητή η συνθάση του γλυκογόνου καταλύει την επιμήκυνση της αλυσίδας γλυκογόνου με ενσωμάτωση υπολειμμάτων γλυκοζυλίου από UDP-γλυκόζη στον αναπτυσσόμενο κλώνο γλυκογόνου, σχηματίζοντας α -1,4-

γλυκοσιδικές συνδέσεις με την απελευθέρωση της UDP. Η UDP αντικαθίσταται από την τελική υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου. (Adeva-Andany et al., 2016)

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου συνίσταται σε τρία βήματα: 1) την απελευθέρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, 2) την ανακατασκευή του υποστρώματος γλυκογόνου για νέα αποικοδόμηση και 3) τη μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό. (Stryer L. et al., 2012)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου διότι διασπά το υπόστρωμα της με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού (P_i) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η φωσφορυλάση σταματά τη διάσπαση των δεσμών α -1,4 όταν φτάσει σε απόσταση 4 καταλοίπων από το σημείο της διακλάδωσης διότι δεν μπορεί να διασπάσει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς α -1,6 που βρίσκονται εκεί. (Zois & Harris, 2016)

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, διότι το απελευθερούμενο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα απέδιδε γλυκόζη η οποία θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη, φορτισμένη αρνητικά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι δυνατόν να μεταφερθεί έξω από το κύτταρο. (Stryer L. et al., 2012)



Εικόνα 3 :Σύνοψη της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου (Bollen, Keppens, & Stalmans, 1998)

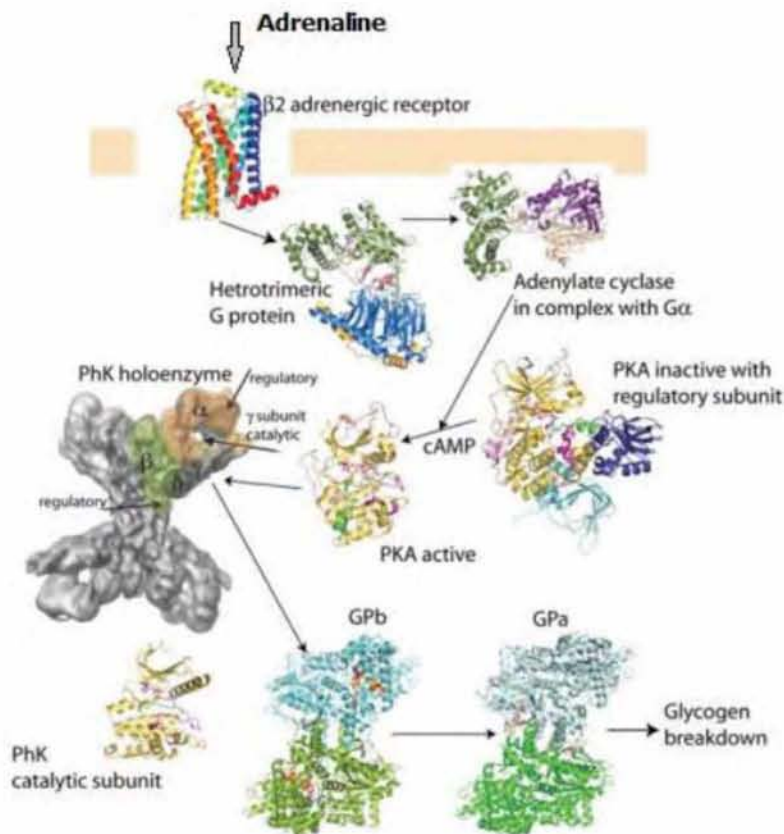
1.3 Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου είναι απαραίτητο να ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια λόγω της μεγάλης σημασίας που έχει για τον οργανισμό. Η πρωτεϊνική κινάση A ενεργοποιεί με φωσφορυλίωση την κινάση της φωσφορυλάσης, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A, του πρώτου βήματος αυτής της ενζυμικής ενεργοποίησης, επάγουν οι ορμόνες επινεφρίνη και γλυκαγόνη. Αυτό συνεπάγεται με το ότι αυτές οι ορμόνες τελικά επηρεάζουν την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. (Stryer L. et al., 2012)

Η επινεφρίνη (αδρεναλίνη) είναι μια ορμόνη της οικογένειας των κατεχολαμινών, εκκρίνεται από το μυελό των επινεφριδίων και διεγείρει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου με πιο έντονη επίδραση στους μύες από ότι στο ήπαρ. Η επινεφρίνη προσδέεται στον GPCR υποδοχέα της στους μύες στην επιφάνεια του κυττάρου, και ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι όπου μέσω του κυκλικού AMP ενεργοποιείται η πρωτεϊνική κινάση A. (Stryer L. et al., 2012)

Η γλυκαγόνη είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα α του παγκρέατος όταν η συγκέντρωση του σακχάρου στο αίμα είναι χαμηλή. Μέσω του υποδοχέα της, τον υποδοχέα της γλυκαγόνης, έναν GPCR υποδοχέα, ενεργοποιεί ένα μονοπάτι το οποίο μέσω του κυκλικού AMP έχει ακριβώς την ίδια δράση με το μονοπάτι που ενεργοποιεί η επινεφρίνη δηλαδή την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A. (Stryer L. et al., 2012)

Η ινσουλίνη αντίθετα με τις άλλες 2 ορμόνες ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 επάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 καταλύει την αποφωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία απενεργοποιείται. Επιπλέον καταλύει και την αποφωσφορυλίωση της συνθάσης του γλυκογόνου, ενεργοποιώντας την, αλλά και την αποφωσφορυλίωση της κινάσης της φωσφορυλάσης απενεργοποιώντας την. (Stryer L. et al., 2012)



Εικόνα 4: Τρισδιάστατες δομές των μορίων που συμμετέχουν σε κάθε βήμα του σηματοδοτικού μονοπατιού αποικοδόμησης του γλυκογόνου που επάγεται από την πρόσδεση της αδρεναλίνης στους β2-αδρενεργικούς υποδοχείς. (Johnson, 2009)

2. Διαταραχές του μεταβολισμού του γλυκογόνου

2.1 Γλυκογονιώσεις

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου αποτελεί βασικό κομμάτι για τους ζώντες οργανισμούς και συνεπώς οποιαδήποτε διαταραχή σε κάποια από τα στάδια του μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές ασθένειες. Η ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα σε αυτή την περίπτωση θα διαταραχθεί, έχοντας σαν αποτέλεσμα σοβαρές συνέπειες. Οι νόσοι εναπόθεσης γλυκογόνου είναι γνωστές κληρονομικές μεταβολικές διαταραχές, οι οποίες οφείλονται σε έλλειψη ενζύμων που συμμετέχουν στην αποδόμηση του γλυκογόνου, λόγω μεταλλάξεων. Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί οχτώ ασθένειες που σχετίζονται με την αποθήκευση του γλυκογόνου. (2) Κάποιες από τις σημαντικότερες γλυκογονιώσεις παρουσιάζονται παρακάτω:

i) Νόσος Mc Ardle: Χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στους μύες. Για το λόγο αυτό οι μύες δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν

τις εφεδρείες του γλυκογόνου για να κερδίσουν ενέργεια με αποτέλεσμα ο ασθενής να αδυνατεί να εκτελέσει δύσκολες ασκήσεις λόγω επώδυνων μυϊκών συσπάσεων. Στα κύτταρα των μυών των ασθενών που πάσχουν από αυτή τη νόσο το pH γίνεται πιο αλκαλικό κατά τη διάρκεια της άσκησης λόγω αποδόμησης της φωσφοκρεατίνης ενώ αντίθετα το pH των κυττάρων των σκελετικών μυών φυσιολογικών ατόμων μειώνεται λόγω παραγωγής γαλακτικού οξέος. (Karslon P et al, 2005) (Stryer L. et al., 2012)

ii) Νόσος Hers : Είναι μία αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή, που προκαλεί απώλεια της δραστηριότητας της GP λόγω μεταλλάξεων που έχουν συμβεί στο γονίδιο PYGL, που κωδικοποιεί την ισομορφή της HGP. Είναι μία σπάνια διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από ηπατομεγαλία και μειωμένη γλυκογεννητική απόκριση στην έγχυση γλυκαγόνης. Ο αριθμός των τεκμηριωμένων περιπτώσεων είναι μικρός, ίσως επειδή η τελική διάγνωση απαιτεί την ανάλυση βιοψίας ήπατος για τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης παρουσία και απουσία του ενζύμου ενεργοποιητή της, της κινάσης της φωσφορυλάσης. (Newgard, Fletterick, Anderson, & Lebo, 1987)

iii) Νόσος von Gierke: Χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Ήταν η πρώτη απόδειξη κληρονομικής ανεπάρκειας ενός ενζύμου του ήπατος. Η απουσία αυτού του ενζύμου στο ήπαρ προκαλεί υπογλυκαιμία καθώς δεν μπορεί να παραχθεί γλυκόζη από την 6-φωσφορική γλυκόζη. Έτσι η παρουσία της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε περίσσεια προκαλεί αύξηση της γλυκόλυσης στο ήπαρ οδηγώντας σε αύξηση του γαλακτικού και του πυροσταφυλικού στο αίμα. Οι ασθενείς παρουσιάζουν μεγάλη διόγκωση της κοιλίας που οφείλεται στη μεγάλη αύξηση μάζας του ήπατος. (Stryer L. et al., 2012)

iv) Νόσος Andersen: Χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου. Η ανεπάρκεια του ενζύμου διακλάδωσης είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή που οδηγεί σε ενδοκυτταροπλασματική συσσώρευση ασυνήθιστα διακλαδισμένου γλυκογόνου που μοιάζει με την αμυλοπηκτίνη σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, του σκελετικού μυός και του σπλήνα. Το νεογέννητο παρουσιάζει συνήθως καρδιομυοπάθεια και βαθιά μυϊκή υποτονία που οδηγεί σε αναπνευστική δυσχέρεια που απαιτεί μηχανικό αερισμό. Σε πρώιμη παιδική ηλικία, οι ασθενείς με ανεπάρκεια του ενζύμου συνήθως αναπτύσσουν ηπατική δυσλειτουργία και προοδευτική κίρρωση του ήπατος που μπορεί να απαιτεί μεταμόσχευση ήπατος. Μερικοί ασθενείς εμφανίζουν μυϊκή αδυναμία και διασταλμένη καρδιομυοπάθεια. (Bollen et al., 1998)

Τύπος	Ένζυμο που λείπει	Όργανο που προσβάλλεται	Γλυκογόνο στο όργανο που προσβάλλεται	Κλινικά χαρακτηριστικά
I ΝΟΣΟΣ VON GIERKE	Φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης	Ήπαρ και νεφροί	Αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Διογκωμένο ήπαρ. Αδυναμία ανάπτυξης. Πολύ σοβαρή υπογλυκαιμία, κέτωση, υπερουρικαιμία, υπερλιπιδαιμία.
II ΝΟΣΟΣ POMPE	α -1,4-Γλυκοζιτάση (λυσosomal)	Όλα τα όργανα	Πολύ αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Οι ασθενείς πεθαίνουν συνήθως πριν κλείσουν δύο έτη ζωής, από καρδιοαναπνευστική ανεπάρκεια.
III ΝΟΣΟΣ CORI	Αμυλο-1,6-γλυκοζιτάση (ένζυμο αποδιακλάδωσης)	Μύες και ήπαρ	Αυξημένη ποσότητα, μικρές εξωτερικές διακλαδώσεις.	Όπως η τύπου I, με ηπιότερη όμως εξέλιξη.
IV ΝΟΣΟΣ ANDERSEN	Ένζυμο διακλάδωσης (α -1,4 \rightarrow α -1,6)	Ήπαρ και σπλήνας	Κανονική ποσότητα, πολύ επιμήκεις εξωτερικές διακλαδώσεις.	Σταδιακή κίρρωση του ήπατος. Η προκύπτουσα ηπατική ανεπάρκεια προκαλεί τον θάνατο συνήθως πριν από την ηλικία των δύο ετών.
V ΝΟΣΟΣ McARDLE	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	Μύες	Ελαφρώς αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Περιορισμένη δυνατότητα για έντονη άσκηση, λόγω επώδυνων μυϊκών συσπάσεων. Κατά τα άλλα, οι ασθενείς είναι φυσιολογικοί και η ανάπτυξή τους κανονική.
VI ΝΟΣΟΣ HERS	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	Ήπαρ	Αυξημένη ποσότητα.	Όπως και η τύπου I, με ηπιότερη όμως πορεία.
VII	Φωσφοφρουκτοκινάση	Μύες	Αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Όπως και η τύπου V.
VIII	Κινάση της φωσφορυλάσης	Ήπαρ	Αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Μικρής έκτασης διόγκωση του ήπατος. Ήπια υπογλυκαιμία.

Σημείωση: Οι τύποι I έως VII κληρονομούνται ως αυτοσωματικοί υπολειπόμενοι. Ο τύπος VIII είναι φυλοσύνδετος.

Πίνακας 1: Νόσοι αποθήκευσης γλυκογόνου (Stryer L. et al., 2012)

2.2 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια ασθένεια που ανήκει στις διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Δεν αποτελεί μια μεμονωμένη διαταραχή αλλά ένα σύνολο διαταραχών που όλες έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Υπάρχουν 2 κύριοι τύποι διαβήτη που ευθύνονται για το 95% του συνόλου των περιπτώσεων της νόσου.

2.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I

Ο διαβήτης τύπου 1 αντιπροσωπεύει μόνο το 5-10% όλων των περιπτώσεων διαβήτη. Είναι μια κατάσταση στην οποία η καταστροφή των παγκρεατικών β-κυττάρων οδηγεί συνήθως σε απόλυτη ανεπάρκεια ινσουλίνης και για αυτό και ονομάζεται και ινσουλινοεξαρτώμενος. Συχνά καλείται και νεανικός σακχαρώδης διαβήτης, διότι η συνήθης ηλικία ανάπτυξης του είναι τα 14 χρόνια. Διαπιστώνονται δύο μορφές: ο τύπος 1A που προκύπτει από κυτταρομεσολαβούμενη αυτοάνοση προσβολή στα β κύτταρα, ενώ ο τύπος 1B (λιγότερο συχνός) δεν έχει καμία γνωστή αιτία και εμφανίζεται κυρίως σε άτομα ασιατικής ή αφρικανικής καταγωγής, που έχουν διαφορετικούς βαθμούς ανεπάρκειας ινσουλίνης λόγω σποραδικών επεισοδίων κετοξέωσης. Η διαταραχή έχει ένα ισχυρό γενετικό συστατικό, κληρονομείται κυρίως μέσω του συμπλέγματος HLA, αλλά οι παράγοντες που προκαλούν την εμφάνιση κλινικής νόσου παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Η διαχείριση του διαβήτη τύπου 1 απαιτεί συνεχή προσοχή σε πολλές πτυχές, όπως η χορήγηση ινσουλίνης, η παρακολούθηση της γλυκόζης

αίματος, ο προγραμματισμός των γευμάτων και ο έλεγχος για συνυπάρχουσες παθήσεις και επιπλοκές σχετιζόμενες με το διαβήτη. Αυτές οι επιπλοκές συνίστανται σε μικροαγγειακές και μακροαγγειακές παθήσεις, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τη μεγάλη νοσηρότητα και θνησιμότητα που σχετίζεται με τον διαβήτη τύπου 1. (Daneman, 2006)

2.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Ο διαβήτης τύπου 2 (T2D) είναι μια ετερογενής ασθένεια η οποία αντιπροσωπεύει το 90-95% των ατόμων με διαβήτη και οφείλεται σε ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης (αντίσταση στην ινσουλίνη). Η αντίσταση στην ινσουλίνη λέγεται ότι είναι παρούσα όταν οι βιολογικές επιδράσεις της ινσουλίνης είναι μικρότερες από τις αναμενόμενες τόσο για τη διάθεση της γλυκόζης στους σκελετικούς μύες όσο και για την καταστολή της ενδογενούς παραγωγής γλυκόζης κυρίως στο συκώτι. Οι διάφοροι παράγοντες που συμβάλλουν στην παθογένεση του διαβήτη τύπου 2 επηρεάζουν τόσο την έκκριση ινσουλίνης όσο και τη δράση της. Η μειωμένη έκκριση ινσουλίνης θα μειώσει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους της. Σπουδαίος παράγοντας για την ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 είναι η παχυσαρκία. Η παχυσαρκία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ανοχής στην ινσουλίνη, πιθανόν λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. (Stumvoll, Goldstein, & van Haeften, 2005)

Η σχετική σημασία της αντοχής στην ινσουλίνη και της δυσλειτουργίας των β-κυττάρων στην παθογένεση του διαβήτη τύπου 2 συζητήθηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ πολλοί θεωρούν ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη ήταν η πρωτογενής ανωμαλία με την ανικανότητα έκκρισης ινσουλίνης να εμφανίζεται αργότερα. (Kahn, Cooper, & Del Prato, 2014)

Αρχικά βήματα για την θεραπεία της νόσου αποτελούν οι παρεμβάσεις στον τρόπο ζωής κάτι που ισχύει και στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου I. Με μέτρια άσκηση και απώλεια βάρους μειώνεται ο κίνδυνος εξέλιξης της διαταραγμένης αντίστασης στην ινσουλίνη σε έκδηλο σακχαρώδη διαβήτη και μπορεί να βελτιώσει πολλές από τις ακόλουθες επιπτώσεις αυτού του μεταβολικού συνδρόμου. Η φαρμακευτική αγωγή αποτελεί ένα βασικό βήμα ειδικά σε πιο προχωρημένα στάδια του διαβήτη. Η χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης είναι το πρώτο βήμα. Η επαρκής διαθεσιμότητα ινσουλίνης είναι ουσιώδης για την βέλτιστη δράση των υπόλοιπων φαρμάκων, ενώ επίσης μπορεί να έχει και σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στη μείωση των φλεγμονών και ειδικά στο αγγειακό σύστημα. (Kahn et al., 2014) Παραδείγματα φαρμακευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για την διαχείριση του διαβήτη τύπου II είναι η σουλφονουλουρία και η μετφορμίνη οι οποίες έχουν ως στόχο την ενίσχυση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο

αίμα αλλά και την μείωση των επακόλουθων προβλημάτων στα οποία οδηγεί ο διαβήτης. (Treadway, Mendys, & Hoover, 2001)

Φάρμακα για τη διαχείριση του διαβήτη τύπου II

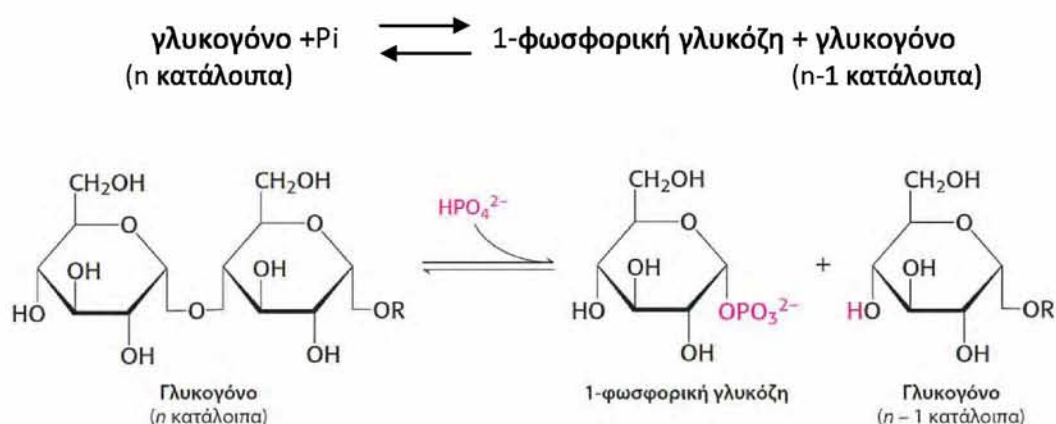
- I. ινσουλίνη
 - II. σουλφονυλουρίες
 - III. διγουανιδίνες (μετμορφίνη)
 - IV. αναστολείς της α-γλυκοζιτάσης
 - V. θειαζολιδινεδιόνες
- (Katzung B, 2009)

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα τρέχοντα φάρμακα για τη θεραπεία της νόσου σχετίζονται με πολλές ανεπιθύμητες παρενέργειες, μεταξύ των οποίων και κίνδυνος υπογλυκαιμίας. Συνεπώς υπάρχει ανάγκη για νέες και καλύτερες θεραπείες. Ο έλεγχος της γλυκογονόλυσης είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης αίματος στο T2D. Γίνονται προσπάθειες για τη στόχευση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II με τη χρήση αναστολέων του ενζύμου αυτού. (Rath, Ammirati, Danley, et al., 2000)

3.Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

3.1 Γενικά στοιχεία

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου(GP) είναι το βασικό ένζυμο στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου, που δρα ως καταλύτης στην αποικοδομητική φωσφορόλυση του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P). (Tsitsanou et al., 2013)



Εικόνα 5: Αντίδραση φωσφορόλυσης (Stryer L. et al., 2012)

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου δηλαδή τα άκρα με μια ελεύθερη υδροξυλική ομάδα στον άνθρακα 4. Το ορθοφωσφορικό διασπά τον γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ C-1 του τελικού καταλοίπου και C-4 του γειτονικού καταλοίπου. Ειδικότερα διασπά τον δεσμό μεταξύ του ατόμου άνθρακα C-1 και του γλυκοζιτικού ατόμου οξυγόνου, ώστε να διατηρείται η διαμόρφωση α στον C-1. Η αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση είναι αναστρέψιμη και η αναλογία των συγκεντρώσεων ισορροπίας [1-φωσφορική γλυκόζη] / [P_i] είναι 0,28 σε pH 6,8. Ωστόσο, *in vivo* το ένζυμο δρα μόνο προς την κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου επειδή στο κύτταρο η συγκέντρωση ανόργανου φωσφορικού υπερβαίνει σημαντικά εκείνη της 1-φωσφορικής γλυκόζης. (Stryer L. et al., 2012) (Livanova, Chebotareva, Eronina, & Kurganov, 2002)

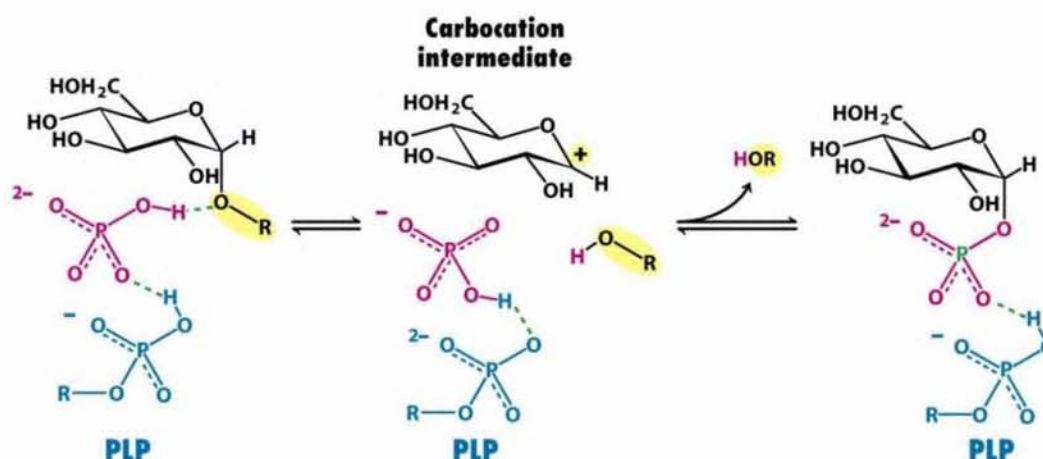
Στον άνθρωπο υπάρχουν τρία ισοένζυμα της φωσφορυλάσης που παίρνουν το όνομα τους από τους ιστούς στους οποίους εκφράζονται κατά κύριο λόγο δηλαδή στο ήπαρ, τους μυς και στον εγκέφαλο. Ενώ τα ισοένζυμα των μυών και του εγκεφάλου εξυπηρετούν τους ιστούς στους οποίους βρίσκονται, ο ρόλος του ισοενζύμου του ήπατος είναι να ικανοποιεί τις γλυκαιμικές απαιτήσεις του σώματος στο σύνολό του. Και τα τρία ανθρώπινα ισοένζυμα ρυθμίζονται αλλοστερικά από μικρούς μοριακούς τελεστές και από φωσφορυλίωση στη Ser-14, προκαλώντας μεταγωγή μεταξύ ενεργών και αδρανών διαμορφώσεων. (Rath, Ammirati, LeMotte, et al., 2000)

3.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η PLP συμμετέχει ως συμπράγοντας σε αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις μεταβολισμού των αμινοξέων. Ως βάση όλων αυτών των αντιδράσεων είναι ο κοινός μηχανισμός που ανακαλύφθηκε πρώτα από τους Braunstein και Shemyakin και από τον Snell και τους συναδέλφους του. Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, το κύριο ενδιαμέσο στάδιο στις αντιδράσεις αυτού του τύπου είναι ο σχηματισμός μιας βάσης Schiff μεταξύ φωσφορικής πυριδοξάλης (ή φωσφορικής πυριδοξαμίνης) και κατάλληλου αμινοξέος (ή κετο οξέος). Ο συμπράγοντας δεσμεύεται ως βάση Schiff με την ε - αμινομάδα του αντίστοιχου υπολείμματος λυσίνης του μορίου της πρωτεΐνης. Η παρουσία αυτού του δεσμού είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση της καταλυτικής δραστηριότητας. (Livanova et al., 2002)

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και είναι συμπράγοντας για την δραστικότητα του ενζύμου. Σήμερα είναι κοινώς αποδεκτός ο μηχανισμός που προτείνεται από τον Helmfreich και τους συνεργάτες του. Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP λειτουργεί στη φωσφορυλάση υπό τη μορφή διανιόντος δηλαδή ως δότης πρωτονίων και στη συνέχεια ως δέκτης πρωτονίων σύμφωνα με

το γενικό σχήμα της κατάλυσης οξέος-βάσης. Το ορθοφωσφορικό ιόν δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο της αποχωρούσας αλυσίδας του γλυκογόνου και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το σχηματιζόμενο καρβοκατιόν σταθεροποιείται με φωσφορικό ανιόν. Η επακόλουθη ομοιοπολική σύνδεση του φωσφορικού προκαλεί το σχηματισμό 1-φωσφορικής γλυκόζης. (Livanova et al., 2002)



Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4^{2-} (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζυτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου από τη πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης πυριδοξάλης (μπλε). (Stryer L. et al., 2012)

3.3 Αλλοστερική ρύθμιση της φωσφορυλάσης

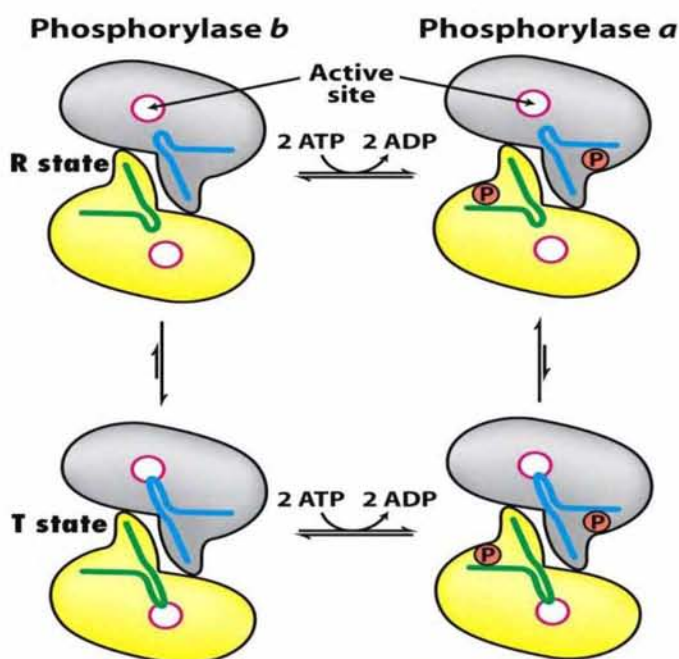
Η βιολογική δραστηριότητα πολλών πρωτεϊνών ελέγχεται από ειδικούς μεταβολίτες οι οποίοι δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με τα υποστρώματα ή τα προϊόντα των αντιδράσεων. Η επίδραση αυτών των ρυθμιστικών παραγόντων προκύπτει αποκλειστικά από αλλαγή διαμόρφωσης (αλλοστερική μετάβαση) που επάγεται στην πρωτεΐνη όταν δεσμεύει τον παράγοντα. Προτείνεται ότι αυτός ο μηχανισμός διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταβολικής δραστηριότητας και πιθανώς στον ειδικό έλεγχο της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου-αλλοστερικού τελεστή δεν ενεργοποιεί μια αντίδραση στην οποία εμπλέκεται ο ίδιος ο τελεστής: προκαλεί μόνο μία διακεκριμένη αναστρέψιμη μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης η οποία τροποποιεί τις ιδιότητες της δραστικής θέσης, μεταβάλλοντας μία ή περισσότερες από τις κινητικές παραμέτρους που χαρακτηρίζουν τη βιολογική δραστηριότητα της πρωτεΐνης. (Monod, Changeux, & Jacob, 1963)

Η GP ελέγχεται από αλλοστερικούς τελεστές και αντιστρεπτή φωσφορυλίωση. Υπάρχει σε δύο τουλάχιστον μετατρέψιμες μορφές, μία κατάσταση T χαμηλής

δραστηκότητας και εξειδίκευσης υποστρώματος και μία κατάσταση R υψηλής δραστηκότητας και ειδικότητας υποστρώματος, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία. Η φωσφορυλίωση από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) ή η δέσμευση διαφόρων αλλοστερικών ενεργοποιητών, όπως το AMP, μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση R. Αντίθετα, η αποφωσφορυλίωση από τη φωσφατάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ή η σύνδεση αναστολέων όπως η γλυκόζη προάγουν τη μετάβαση από την κατάσταση R σε T. (Livanova et al., 2002)

3.3.1 Μυϊκή φωσφορυλάση

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρεπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργό κατάσταση b. Η συνήθης κατάσταση της φωσφορυλάσης των μυών είναι η b διότι στους μυς η φωσφορυλάση χρειάζεται να είναι ενεργή κατά τη σύσπαση των μυών. (Stryer L. et al., 2012)

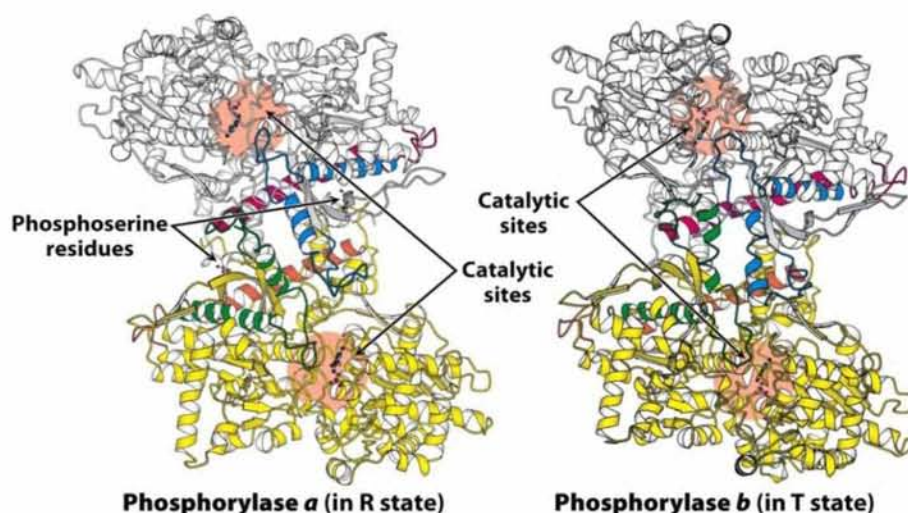


Εικόνα 7: Ρύθμιση της φωσφορυλάσης. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού κατάστασης R και μιας λιγότερο ενεργού κατάστασης T. Η φωσφορυλάση b είναι συνήθως ανενεργός διότι η ισορροπία ευνοεί την κατάσταση T ενώ η φωσφορυλάση a είναι συνήθως ενεργός διότι η ισορροπία ευνοεί τη κατάσταση R. (Stryer L. et al., 2012)

Η μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R συνεπάγεται μια στροφή 10° γύρω από τον άξονα συμμετρίας του διμερούς. Αυτό όμως προκαλεί δομικές αλλαγές στις α-έλικες οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή καθώς το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς φραγμένο ενώ αντίθετα το καταλυτικό κέντρο στην κατάσταση R είναι

πιο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το φωσφορικό είναι καλά διευθετημένη. (Stryer L. et al., 2012)

Η φωσφορυλάση α και η φωσφορυλάση β διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η φωσφορυλάση β μετατρέπεται σε α όταν φωσφορυλιωθεί στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας μέσω ενός ενζύμου, της κινάσης της φωσφορυλάσης. (Stryer L. et al., 2012)



Εικόνα 8: Δομή της φωσφορυλάσης α και της φωσφορυλάσης β. Η φωσφορυλάση α φωσφορυλιώνεται στη Ser 14 κάθε υπομονάδας και η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης R. Η μια υπομονάδα παρουσιάζεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι θηλιές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα δείχνεται με κίτρινο χρώμα και οι ρυθμιστικές δομές με πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση β δεν είναι φωσφορυλιωμένη και υπάρχει κυρίως στη κατάσταση T. Τα καταλυτικά κέντρα σε αυτή την περίπτωση είναι μερικώς φραγμένα. (Stryer L. et al., 2012)

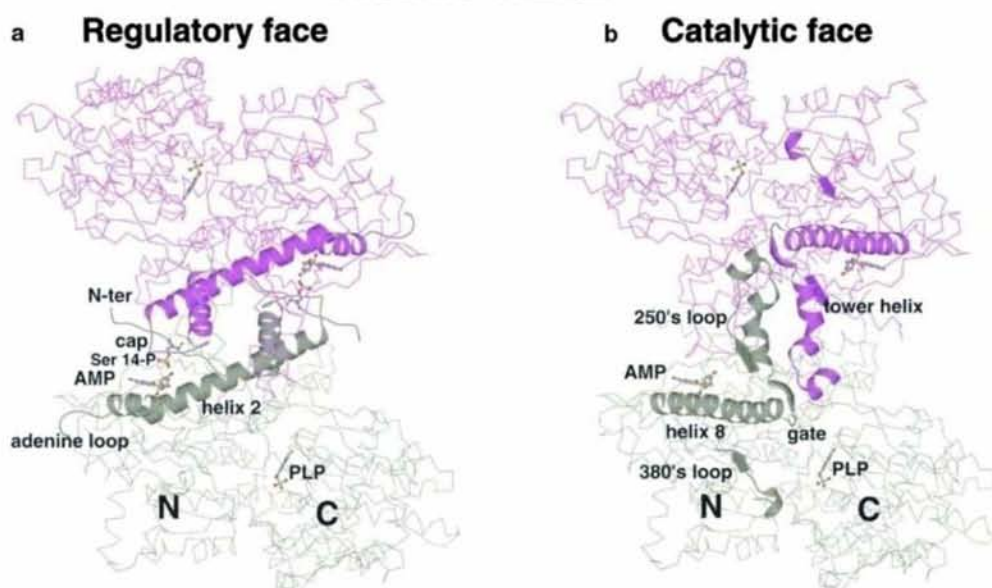
Η μη φωσφορυλιωμένη μορφή(b) του μυϊκού ενζύμου ενεργοποιείται ισχυρά από το AMP και η σύνδεση είναι συνεργιστική. Αυτό σταθεροποιεί την ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου (κατάσταση R). Η δέσμευση του AMP μπορεί να ανασταλεί ανταγωνιστικά από το ATP που δρα ως αρνητικός αλλοστερικός τελεστής. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης β από την ενεργό κατάσταση R στη λιγότερο ενεργό κατάσταση T και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Η φωσφορυλάση α αντίθετα είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα του ATP και του AMP. (Stryer L. et al., 2012) (Rath, Ammirati, LeMotte, et al., 2000)

3.3.2 Ηπατική φωσφορυλάση

Η ηπατική φωσφορυλάση του ανθρώπου είναι ένα ομοδιμερές που αποτελείται από 846 κατάλοιπα σε κάθε υπομονάδα. Ρυθμίζεται με ομοιοπολική τροποποίηση δηλαδή με φωσφορυλίωση ενός υπολειμματος σερίνης στο N-τελικό άκρο και με

αλλοστερικούς μηχανισμούς. Η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος (φωσφορυλάση-β) είναι ουσιαστικά ανενεργή στο ήπαρ και μόνο η φωσφορυλιωμένη μορφή (φωσφορυλάση-α) συμβάλλει στην γλυκογονόλυση. Η φωσφορυλίωση καταλύεται από την κινάση της φωσφορυλάσης(Phk) η οποία ενεργοποιείται από cAMP και αυξημένη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου και η αποφωσφορυλίωση καταλύεται από την καταλυτική μονάδα πρωτεϊνικής φωσφατάσης-1 σε συνδυασμό με πρωτεΐνες στόχευσης γλυκογόνου. (Rath, Ammirati, LeMotte, et al., 2000) (Hampson et al., 2006)

Active HLGP



Εικόνα 9 : Δομή της δραστικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ανθρώπινου ήπατος. Το διμερές έχει δυο επικράτειες τη ρυθμιστική και την καταλυτική. Η ρυθμιστική περιέχει τη θέση σύνδεσης AMP και τη θέση φωσφορυλίωσης(α)ενώ η καταλυτική συνδέεται με το μόριο του γλυκογόνου(β) (Rath, Ammirati, LeMotte, et al., 2000)

Η ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στο ήπαρ διαφέρει συγκριτικά με αυτή των μυών. Στους μυς η συνήθης κατάσταση είναι η μορφή b καθώς δεν υπάρχει ανάγκη παραγωγής γλυκόζης όταν ο οργανισμός δεν χρειάζεται ενέργεια. Αντίθετα η συνήθης κατάσταση της ηπατικής φωσφορυλάσης είναι η μορφή a διότι ο ρόλος της είναι η παραγωγή γλυκόζης για τροφοδότηση σε άλλους ιστούς όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλά. Στην ουσία το ένζυμο επιστρέφει στην κατάσταση T μόνο αν ανιχνεύσει την παρουσία επαρκούς γλυκόζης. Επιπλέον η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από το AMP όπως συμβαίνει σε έναν συσπώμενο μυ διότι το ήπαρ δεν υφίσταται σημαντικές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. (Stryer L. et al., 2012).

3.4 Δομή του ενζύμου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kDa. Η δομή της κάθε υπομονάδας του ενζύμου είναι χαρακτηριστική της α/β τάξης των πρωτεϊνών και κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε δύο περιοχές :

- i) μια αμινοτελική περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 1-484 και περιέχει μια θέση πρόσδεσης γλυκογόνου και
- ii) μια καρβοξυτελική περιοχή αποτελούμενη από τα κατάλοιπα 485-842. Οι δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς συνδέονται μεταξύ τους σε δύο θέσεις που βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του ενζύμου. Η μια επαφή σχηματίζεται από την σύνδεση μιας περιοχής που ονομάζεται επικάλυμμα (cap) (κατάλοιπα 35-46 , αποτελείται από μια θηλιά που ενώνει τις έλικες α1 και α2 μεταξύ τους) της μιας υπομονάδας με την αλυσίδα B7 (κατάλοιπα 191-193) και την έλικα α2 (κατάλοιπα 47-78) της άλλης υπομονάδας. Σε αυτή τη θέση διεπαφής βρίσκεται το κέντρο σύνδεσης των αλλοστερικών τελεστών , καθώς και η θέση αναγνώρισης για τη φωσφορυλιωμένη σερίνη. Η άλλη επαφή μεταξύ των δύο υπομονάδων σχηματίζεται από την επαφή μιας περιοχής που ονομάζεται tower και σχηματίζεται από την σύνδεση αντιπαράλληλων ελίκων (κατάλοιπα 262-276) που ενώνουν την υπομονάδα με το καταλυτικό κέντρο. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται σε μία εσωτερική σχισμή που απέχει 15 Å από την επιφάνεια του μορίου και που δημιουργείται μεταξύ της αμινο-τελικής και της καρβοξυτελικής περιοχής και είναι κοντά στον συμπαράγοντα PLP του ενζύμου. (Barford, Hu, & Johnson, 1991)

Έχουν αναγνωριστεί 6 διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου: το καταλυτικό κέντρο, το αλλοστερικό κέντρο, το νέο αλλοστερικό κέντρο, το κέντρο αναστολής, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου και το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης που ανακαλύφθηκε πρόσφατα.

Ι. το καταλυτικό

Η καταλυτική θέση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου περιλαμβάνει τον βασικό συμπαράγοντα PLP που βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας της GP, και είναι προσβάσιμη στο διαλύτη μέσω ενός καναλιού μήκους 15 Å. Οι αναστολείς που δεσμεύονται στην καταλυτική θέση σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-287), εμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος και προωθώντας την κατάσταση T. Παρόλο που ο πρωταρχικός στόχος για την ανακάλυψη των αναστολέων της GP είναι το ανθρώπινο ήπαρ (HLGPb) οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου που προέρχεται από μύες κουνελιών, εξαιτίας της διαθεσιμότητας και της ικανότητας να παράγονται υψηλής ποιότητας κρύσταλλοι.

Οι αναστολείς που προσδένονται πιο ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο είναι ανάλογα γλυκόζης. Τα ανάλογα γλυκόζης αποτελούν τους πλέον διερευνημένους αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με α - και β - υποκαταστάσεις στο ανωμερικό C1 άτομο. (Hayes, Kantsadi, & Leonidas, 2014)

II. το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο της GP αποτελείται από τις δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς που βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του μορίου του ενζύμου. Δύο α έλικες (κατάλοιπα 47-78 και 289-314, αντίστοιχα) και τέσσερις β κλώνοι (κατάλοιπα 153-160, 191-193, 222-232 και 237-247) δημιουργούν μια κοιλότητα σχήματος V η οποία κλείνει από μία περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 36 έως 47 της συμμετρικής υπομονάδας, και σχηματίζεται το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο αυτό αναγνωρίζει μια ποικιλία φωσφορυλιωμένων ενώσεων όπως AMP, IMP, ATP, γλυκόζη-6-P, NADH, UDP-γλυκόζη, β -γλυκεροφωσφορικό και ανόργανο φωσφορικό. Η 6- φωσφορική γλυκόζη είναι ο πιο ισχυρός φυσιολογικός αναστολέας της GPb που δεσμεύεται στο αλλοστερικό κέντρο. Η σύνδεση των προσδετών σε αυτό το κέντρο αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, είτε ανταγωνίζοντας την AMP που είναι φυσιολογικός ενεργοποιητής είτε σταθεροποιώντας την ανενεργό διαμόρφωση T του ενζύμου. (Hayes et al., 2014)

III. το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο κέντρο ή θέση πρόσδεσης ινδόλης, βρίσκεται εντός της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς ενζύμου που σχηματίζεται από τη σύνδεση των δύο υπομονάδων και απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Η κεντρική κοιλότητα του νέου αλλοστερικού κέντρου σχηματίζεται στο ένα άκρο από κατάλοιπα της περιοχής cap και έλικες $\alpha 2$ (Arg33, His34, Arg60 και Asp61 και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα) και το άλλο άκρο από τον πύργο $\alpha 7$ ελίκων (κατάλοιπα Asn270, Glu273, Ser276 και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα). Τα 18 αμινοξέα (9 από κάθε υπομονάδα) που συνθέτουν αυτό το κέντρο είναι πολύ συντηρημένα στην ανθρώπινη ηπατική και μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου, και στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών, του ήπατος και του εγκεφάλου κονίκλων. Ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας του νέου αλλοστερικού κέντρου είναι το ινδόλιο. Οι αναστολείς που προσδένονται λειτουργούν σαν κλασσικοί αλλοστερικοί αναστολείς σταθεροποιώντας την κατάσταση T (ανενεργή) και εμφανίζουν συνέργεια με άλλους αναστολείς, όπως η γλυκόζη. (Hayes et al., 2014)

IV. το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής το οποίο χαρακτηρίζεται και ως θέση δέσμευσης καφεΐνης, βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η δέσμευση των προσδεμάτων σε

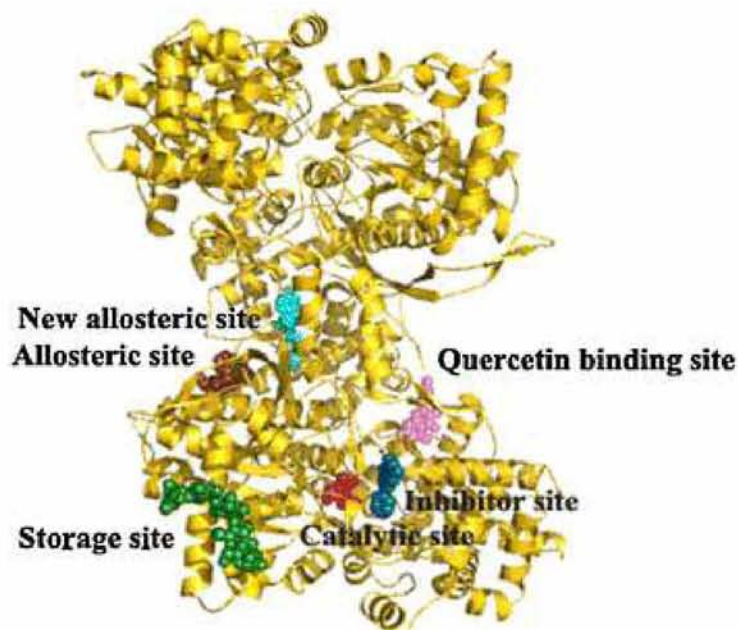
αυτό το κέντρο οφείλεται κυρίως στην παρεμβολή μεταξύ των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Phe285 και Tyr613 μέσω σχηματισμού αλληλεπιδράσεων π-π. Οι προσδέτες είναι πιο ισχυροί παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης. Έτσι, η ανασταλτική δραστηριότητα μπορεί να ρυθμιστεί από τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και να μειωθεί όταν τα επίπεδα γλυκόζης πλησιάσουν στο κανονικό, μειώνοντας τον κίνδυνο για υπεργλυκαιμία. Η καφεΐνη ήταν ο πρώτος αναστολέας που βρέθηκε να δεσμεύεται σε αυτό το κέντρο ($K_i=0,1$ mM). Κατά τη σύνδεση με την gmGPb, η καφεΐνη παρεμβάλλεται μεταξύ 2 αρωματικών καταλοίπων, Phe285 και Tyr613, σχηματίζοντας πολλούς δεσμούς Van der Waals. Πρόσφατα, έχειδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή λειτουργούν ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ωστόσο δεν έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης και διαφορετικά φλαβονοειδή προσδένονται σε διαφορετικά κέντρα σύνδεσης της GP. (Hayes et al., 2014)

V. το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Αυτό το κέντρο βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου της GP περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και αποτελεί την περιοχή όπου συνδέεται το γλυκογόνο *in vivo*. Το κέντρο αποτελείται από δύο έλικες (κατάλοιπα 396 έως 418 και 420 έως 429) και ένα βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλους κλώνους (κατάλοιπα 430 έως 432 και κατάλοιπα 437 έως 411). Για την πρόσδεση α -($K_i=47,1$ mM), β - ($K_i=14,1$ mM) και γ - ($K_i=7,4$ mM) κυκλοδεξτρινών στην gmGPb έχουν γίνει κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες. Η δομική βάση της πρόσδεσης των μελετημένων προσδετών (κυκλικών και γραμμικών) είναι παρόμοια και περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα Ser429, Lys473 και Asn407 και υδατικές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Gln401, Arg426, Val431 και Gln433. (Hayes et al., 2014)

VI. το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Lys544, Arg551, Lys665 και Tyr548 της C-περιοχής και από τα κατάλοιπα Glu120 και Glu123 της N-περιοχής. Αυτό το κέντρο απέχει 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Βρέθηκε ότι η κερσετίνη είναι το πλέον βιοδραστικό συστατικό ανάμεσα σε 13 πολυφαινολικά εκχυλίσματα που προέρχονταν από υποπροϊόντα οινοποίησης της ελληνικής ποικιλίας *Vitis vinifera*. Συγκριτική δομική ανάλυση των T και R διαμορφώσεων, μεταξύ του συμπλέγματος gmGPb – κερσετίνης και της ελεύθερης gmGPb, έδειξαν ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην R-κατάσταση, ενώ στην T-κατάσταση οι διαφορές ήταν μικρές. Επιπλέον, φαίνεται ότι η πρόσδεση της κερσετίνης σε αυτό το κέντρο ευνοεί την λιγότερο ενεργό κατάσταση T, μέσω σταθεροποίησης της διαμόρφωσης του βρόχου (κατάλοιπα 548-556) στην κατάσταση T. (Hayes et al., 2014)



Εικόνα 10: Διμερές φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που απεικονίζει τις θέσεις των διαφορετικών κέντρων δέσμευσης. (Hayes et al., 2014)

3.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Ο έλεγχος των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα αποτελεί βασικό στόχο για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Παρά τη διαθεσιμότητα διαφορετικών κατηγοριών υπογλυκαιμικών φαρμάκων, τα θεραπευτικά σχήματα συχνά δεν επιτυγχάνουν έναν ικανοποιητικό βαθμό ελέγχου της γλυκόζης στο αίμα ώστε να μειωθεί η συχνότητα και η σοβαρότητα των διαβητικών επιπλοκών. Η παραγωγή ηπατικής γλυκόζης είναι αυξημένη στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και τα στοιχεία δείχνουν ότι η γλυκογονόλυση είναι σημαντικός παράγοντας αυτής της αύξησης. (Treadway et al., 2001)

Η ανακάλυψη φαρμάκων που στοχεύουν στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί μία συνεχή πρόκληση και στηρίζεται σε μελέτες που αφορούν την κρυσταλλική δομή τόσο της ενεργής όσο και της ανενεργής μορφής του ενζύμου. Πληθώρα δεδομένων υψηλής ανάλυσης της δομής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχουν πυροδοτήσει τις προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων αναστολέων βασιζόμενων στη δομή του ενζύμου. Η αποτελεσματικότητα τέτοιων ουσιών έχει επιβεβαιωθεί από μελέτες σε κύτταρα *ex vivo* καθώς και σε πειραματόζωα, επικυρώνοντας έτσι την φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως έναν σημαντικό στόχο για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. (Skamnaki V.T, 2013)

Η πλειοψηφία των αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι ανάλογα γλυκόζης που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο και ανταγωνίζονται για τη δέσμευση με το υπόστρωμα. Στόχος είναι η εύρεση ενός αναστολέα που θα έχει

δράση παρόμοια με αυτή της γλυκόζης αλλά θα δρα σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτή. Πρόσφατα η φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει χρησιμοποιηθεί για σάρωση φυσικών προϊόντων με σκοπό να ανακαλυφθούν λειτουργικά τρόφιμα που θα ρυθμίζουν τα επίπεδα γλυκόζης σε ασθενείς σε σακχαρώδη διαβήτη. Μελέτες σε διαβητικά και μη ποντίκια έδειξαν ότι συγκεκριμένα φλαβονοειδή συμβάλλουν στην υπογλυκαιμία. Τα φλαβονοειδή είναι φυσικές ενώσεις που εμφανίζονται σε μεγάλες ποσότητες στα φυτά και είναι η πιο κοινή κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων της διατροφής του ανθρώπου. (Kyriakis et al., 2015)

3.6 Σχεδιασμός φαρμάκων

Στις μέρες μας, η ανακάλυψη νέων φαρμάκων βασίζεται στην χρήση βιολογικών στόχων, γενετικών μελετών, διαγονιδιακών ζώων, μοριακής βιολογίας, γονιδιακής τεχνολογίας και των πρωτεϊνών. Ο προκλινικός έλεγχος σε ένα υποψήφιο φαρμακευτικό μόριο αφορά μια διαδοχική σειρά πειραματικού χαρακτηρισμού που αποκαλείται δοκιμαστικός έλεγχος φαρμάκων. Μια ποικιλία από βιολογικές αναλύσεις σε μοριακό, κυτταρικό και οργανικό επίπεδο καθώς και σε ολόκληρο το ζώο χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας και της εκλεκτικότητας του φαρμάκου. (Katzung B, 2009)

Αρχικά η ουσία θα δοκιμαστεί σε μοριακό επίπεδο για τη συγγένεια της ως προς τις θέσεις σύνδεσης με ένζυμο και στη συγκεκριμένη περίπτωση στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Οι επιδράσεις στην κυτταρική λειτουργία έπειτα πρέπει να μελετηθούν για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας της ουσίας. Οι μελέτες σε πειραματόζωα είναι απαραίτητες για τον καθορισμό της δράσης του υποψήφιου φαρμάκου στα οργανικά συστήματα και σε πειραματικά πρότυπα νοσημάτων. Το σύνολο των παραπάνω μελετών δηλαδή οι δοκιμές *in vitro* σε πρώτο στάδιο και στη συνέχεια *ex vivo* και *in vivo* θα αποδείξουν εάν η ένωση μπορεί να αποτελέσει ένα νέο φάρμακο για να ακολουθήσουν κλινικές δοκιμές. (Katzung B, 2009)



4.Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής Επιστημών Υγείας. Κύριο αντικείμενο της έρευνας αυτής αποτελεί η μελέτη ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου, όπως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία εμπλέκεται στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Απώτερος σκοπός των ερευνών του εργαστηρίου είναι η ανακάλυψη εν δυνάμει φαρμάκων με αντι-υπεργλυκαιμική δράση με σκοπό τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Οι μελέτες που γίνονται έχουν ως στόχο την εύρεση αναστολέων που θα προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο. Αυτοί είναι κυρίως ανάλογα γλυκόζης που σχεδιάστηκαν με βάση την αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου, με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών, με σκοπό να αυξηθούν οι ειδικές αλληλεπιδράσεις στο καταλυτικό κέντρο. Οι αναστολείς θα πρέπει να μιμούνται τη δράση της γλυκόζης και να δρουν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή για να είναι αποδεκτοί ως φαρμακευτικά προϊόντα.

Τα πειράματα *ex vivo* αποτελούν συνέχεια των *in vitro* πειραμάτων για επιβεβαίωση της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων έναντι του ενζύμου. Σκοπός της εργασίας είναι η εκτίμηση της αναστολής 4 ενώσεων στην ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου σε *ex vivo* σύστημα χρησιμοποιώντας ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2. Οι 4 αναστολείς επιλέχθηκαν διότι έχουν μελετηθεί εκτενώς σε *in vitro* πειράματα και μέσω του προσδιορισμού της K_i τους έχει εκτιμηθεί ότι έχουν υψηλή ανασταλτική ικανότητα. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες προκειμένου να διαπιστωθεί η βιολογική αποτίμηση της δράσης τους και ακολούθησε και προσδιορισμός της IC_{50} για τους 2 αναστολείς που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα.

5.Υλικά και μέθοδοι

5.1 Οργανολογία:

Α)Εντός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών

- ❖ Αιμοκυτταρόμετρο (Πλάκα Neubauer)
- ❖ Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης) Kruss Optronic Germany.
- ❖ Αυτόματος πιπεταδόρος (HTL Lab Solution)
- ❖ Ειδικό πλαστικό ξύστρο (scraper)
- ❖ Επωαστικός κλίβανος CO₂ (Galaxy 170S, New Brunswick)
- ❖ Υδατόλουτρο(Selecta)
- ❖ Φυγόκεντρος Entrofriger- BLII/ PS Selecta.
- ❖ Laminar Flow Hood Tel Star AV-30/70.

Β)Στον εργαστηριακό χώρο

- ❖ Ηλεκτρονικός ζυγός Kern
- ❖ Ηλεκτρονικό πεχάμετρο Metrohm
- ❖ Πιπέτες (Gilson όγκων 0,1-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 200- 1.000 µl)
- ❖ Συσκευή παραγωγή υπερήχων (sonicator) helscher Ultrasound Technologies, model UP400S.
- ❖ Υδατόλουτρο WiseBath, Wisd
- ❖ φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός/UV UV- 1600PC Spectrophotometer VWR
- ❖ φυγόκεντρος HermLe Z36HK
- ❖ Vortex MS2 minishaker IKA®

5.2Υλικά:

Αντιδραστήρια	Εταιρία
a-D-Glucose1-phosphate	Sigma
Ammonium Molybdate tetrahydrate	Sigma
Bovine serum Albumine, (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay	Bio-rad
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Life Technologies – Invitrogen
DEX	Riedel-de Haen
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem
Ethanol 70 %	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco

Glycogen	Sigma
Hepes	Serva
Human hepatocellular liver carcinoma cell line HepG2	
Hydrochloric acid (HCl)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma
L-Ascorbic acid	Sigma
L-glutamin	Gibco
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	AppliChem
Potassium chloride (KCl)	Alpha Aesar
Sodium dodecyl Sulfate (SDS)	Serva
Trypsin	Gibco
Tris	Merck
Triton X-100	AppliChem
Zinc acetate	Sigma
Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη	Gibco

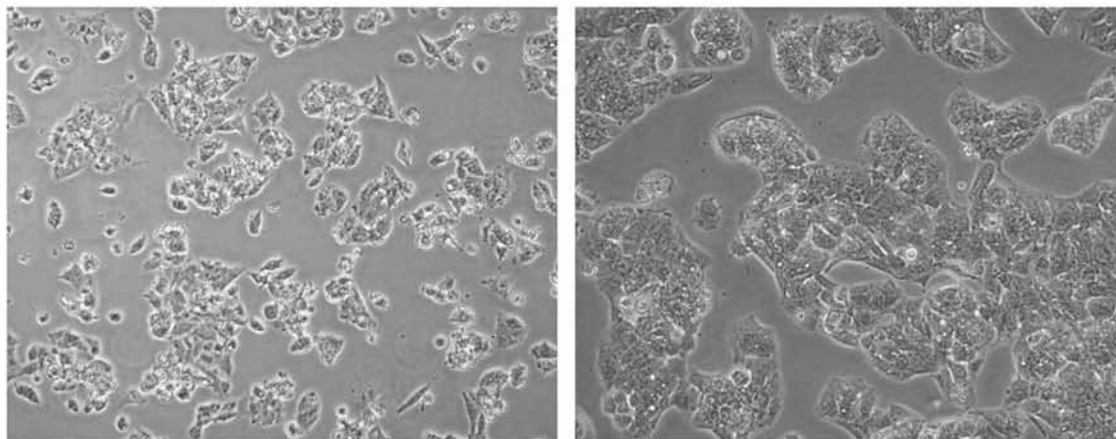
5.3 Αναλώσιμα

- ❖ Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcon) των 15 ml και 50 ml (Sarstedt)
- ❖ Γυάλινες πιπέτες Pasteur (Kimble)
- ❖ Καλυπτρίδες coverslips
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorfs των 1.5 ml (Sarstedt)
- ❖ Ρύγχοι-tips (0.2-10 µL, 20-200 µl και 100-1000 µl) (Sarstedt)
- ❖ Σιφώνια Serological Pipette των 2, 5, 10 & 25 ml (Sarstedt)
- ❖ Φλάσκες για καλλιέργεια κυττάρων, επιφάνειας και 75 cm² (Sarstedt)
- ❖ cryovials για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (Sarstedt)
- ❖ Plates petri 60mm.

5.4 Κύτταρα HepG2

Τα HepG2(Human hepatocellular liver carcinoma cell line) αποτελούν μια συνεχή κυτταρική σειρά προερχόμενη από το ήπαρ ενός 15χρονου Καυκάσιου Αμερικανού με ένα καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα κύτταρα από άποψη μορφολογίας είναι επιθηλιακά και έχουν ένα μοντέλο χρωμοσωμικού αριθμού ίσου με 55. Εκκρίνουν πληθώρα σημαντικών πρωτεϊνών του πλάσματος όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη, αλφα 2- μακροσφαιρίνη, αλφα 1-αντιθρυψίνη και τρανσφερίνη του πλασμινογόνου. Τα HepG2 κύτταρα έχουν αναπτυχθεί επιτυχώς σε μεγάλης κλίμακας συστήματα καλλιέργειας και μπορούν να αποκριθούν σε διέγερση με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη. Λόγω του υψηλού βαθμού της μορφολογικής και

λειτουργικής διαφοροποίησής τους *in vitro*, τα HepG2 κύτταρα είναι ένα κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής μεταφοράς και του μεταβολισμού στο ήπαρ καθώς και για τις μελέτες στόχευσης φαρμάκων. (Costantini, Di Bernardo, Cammarota, Castello, & Colonna, 2013)



Εικόνα 11: κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος HepG2

5.4.1 Συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων HepG2

Τα ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2 αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 4.5g/L το οποίο αποτελεί ένα βασικό θρεπτικό μέσο που αποτελείται από βιταμίνες, αμινοξέα, σάκχαρα, γλυκόζη κι ένα δείκτη του pH ενώ δεν περιέχει πρωτεΐνες και αναπτυξιακούς/αυξητικούς παράγοντες. Το ερυθρό της φαινόλης αποτελεί ένα δείκτη μεταβολής του pH με χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα το οποίο μεταβάλλεται σε πορτοκαλί-κίτρινο με την πάροδο του χρόνου, λόγω της αντίστοιχης μεταβολής του pH, το οποίο μειώνεται από την παρουσία των όξινων μεταβολιτών που παράγουν τα κύτταρα. Η αλλαγή στο χρώμα του μέσου, αποτελεί δείγμα ότι το μέσο πρέπει να αντικατασταθεί. Το διάλυμα DMEM φυλάσσεται στους 2-8°C. Μετά το άνοιγμα της συσκευασίας του θρεπτικού διαλύματος (500 ml), εμπλουτίζεται με προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων:

- 10% Διαλύματος FBS(50 ml), που είναι ορός από το αίμα εμβρύου βοοειδούς. Αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συμπλήρωμα μέσου διότι περιέχει πολλούς αυξητικούς παράγοντες, καθώς και μια μεγάλη ποικιλία από πρωτεΐνες που επιτρέπουν στα κύτταρα υπό καλλιέργεια να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν.
- 1% Διαλύματος μίγματος πενικιλίνης/στρεπτομικίνης, P/S, (5 ml), για την αποφυγή μικροβιακής επιμόλυνσης: 100U/ml P, 100μg/ml S
- 1% Διαλύματος αμινοξέος L-γλουταμίνης 2mM (5 ml)

- ❖ Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστήρα στους 37°C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂.
- ❖ Το υλικό των καλλιιεργειών ανανεώνεται κάθε 48 h και κάθε τρίτη ή τέταρτη μέρα.

5.5 Τεχνικές κυτταροκαλλιιεργειών

Όσον αφορά το χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών είναι σημαντικό να τονιστούν τα εξής :

- I. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιούνται μέσα στον απαγωγό καθέτου νηματικής ροής.
- II. Οτιδήποτε χρησιμοποιείται στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών ψεκάζεται με 70% αιθανόλη πριν εισαχθεί στον απαγωγό.
- III. Οτιδήποτε χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιιεργειες ανοίγει και κλείνει αυστηρά μέσα στον απαγωγό.
- IV. Αφού ολοκληρωθεί η εργασία στον απαγωγό, εφαρμόζεται UV ακτινοβολία για 30min για εσωτερικό καθαρισμό του χώρου.

5.5.1 Ξεπάγωμα κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου είναι αποθηκευμένες σε βαθιά κατάψυξη (θερμοκρασία -80°C). Είναι σημαντικό όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά να αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη για να μεταφέρθουν στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής όπου οι συνθήκες είναι στείρες. Αρχικά το φυαλίδιο cryovial με τα περιεχόμενα κύτταρα τοποθετείται με προσοχή στο υδατόλουτρο στους 37°C, ώστε να ξεπαγώσει. Το πώμα του φυαλιδίου δεν θα πρέπει να βυθίζεται στο νερό του υδατόλουτρου για να αποφευχθεί η μόλυνση. Μετά την πάροδο μερικών λεπτών (3-4 min) το περιεχόμενο του cryovial υγροποιείται και φαίνεται εντός του μία μικρή ποσότητα πάγου. Όταν συμβεί αυτό απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και αφού ψεκαστεί εξωτερικά με αιθανόλη 70% εισέρχεται στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Ακολουθεί η μεταφορά 1 ml των κυττάρων σε πλαστικούς σωλήνες falcon (15 ml) στους οποίους έχει προηγηθεί η προσθήκη 9 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM (συνολικός όγκος 10 ml). Το συγκεκριμένο βήμα πραγματοποιείται γρήγορα, διότι το διάλυμα DMSO, το οποίο καταψύχεται μαζί με τα κύτταρα, αρχίζει να εκφράζει την τοξικότητά του σε αυτά κατά την απόψυξη.

Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5min στα 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να κατακρημνιστούν τα κύτταρα και να διαχωριστούν από το DMSO. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται με γυάλινη πιπέτα Pasteur και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα επαναδιαλυτοποιείται σε 5 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου DMEM.

Το επαναδιαλυτοποιημένο περιεχόμενο λαμβάνεται με πιπέτα των 10ml και τοποθετείται στη φλάσκα. Εκεί, πραγματοποιείται ξανά ήπια επαναδιαλυτοποίηση και αφού είναι έτοιμο τοποθετείται στο μικροσκόπιο προκειμένου να εξεταστούν ο αριθμός και η μορφή των κυττάρων. Είναι απαραίτητο να αναγράφονται τα στοιχεία των κυττάρων στη φλάσκα (όνομα κυτταρικής σειράς, ημερομηνία παγώματος και ξεπαγώματος, passage). Τέλος η φλάσκα με τα κύτταρα μεταφέρεται στον κλίβανο σε συνθήκες 37° C και 5% CO₂ που ευνοούν την ανάπτυξη τους.

5.5.2 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Όταν παρατηρείται με μικροσκόπιο ότι ο κυτταρικός πληθυσμός έχει καλύψει περίπου το 80% του χώρου της φλάσκας τότε πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια με τη χρήση της θρυψίνης. Η θρυψίνη αποτελεί ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο διασπά τις πεπτιδικές αλυσίδες κυρίως στο καρβοξυλικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη ή αργινίνη των πρωτεϊνών που συγκρατούν τα κύτταρα της καλλιέργειας σε συνοχή μεταξύ τους αλλά και προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα γνωστό και ως passage.

Αρχικά, πραγματοποιείται ξεπάγωμα της θρυψίνης και του θρεπτικού υλικού στο υδατόλουτρο στους 37°C και απομακρύνεται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό που υπάρχει στη φλάσκα για να προστεθεί η θρυψίνη. Η ποσότητα θρυψίνης που εφαρμόζεται ποικίλει ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χειριζόμαστε, αλλά κατά κανόνα για τις φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας των 25 cm² προστίθεται 1 ml διαλύματος, ενώ για εκείνες των 75 cm² προστίθενται 3 ml. Η φλάσκα στη συνέχεια ανακινείται έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο και μεταφέρεται στον κλίβανο, στους 37°C, για περίπου 3-4 λεπτά προκειμένου να ασκήσει τη δράση του το ένζυμο. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, η φλάσκα απομακρύνεται από τον κλίβανο και ανακινείται με ελαφρά χτυπήματα προκειμένου τα κύτταρα να αποκολληθούν από το ταπήτιο της φλάσκας και παρατηρούνται στο μικροσκόπιο. Είναι πολύ σημαντικό τα κύτταρα να μην εκτεθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στη θρυψίνη(πάνω από 5min), γιατί θα είναι τοξική για τα κύτταρα. Εφόσον έχουν την εικόνα που επιθυμούμε, η φλάσκα τοποθετείται στο hood με σκοπό να τερματιστεί η δράση της θρυψίνης. Για να πραγματοποιηθεί αυτό προστίθεται τετραπλάσιος όγκος θρεπτικού από τον όγκο της θρυψίνης που χρησιμοποιήθηκε αρχικά. Συνήθως για όγκο διαλύματος θρυψίνης ίσο με 1 ml προστίθενται 4 ml διαλύματος DMEM, ενώ για όγκο ίσο με 3 ml προστίθενται 7 ml θρεπτικού μέσου.

Έπειτα, όλο το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε falcon(15ml)και φυγοκεντρείται για 5min σε 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό μέσο DMEM. Τέλος τα κύτταρα επανατοποθετούνται στη φλάσκα ανάπτυξης, η οποία συμπληρώνεται μέχρι τα 5ml

για T-25 και μέχρι τα 15ml για T-75 με θρεπτικό υλικό DMEM και τοποθετούνται στον κλίβανο.

5.5.3 Ψύξη κυττάρων

Είναι μια διαδικασία η οποία χρησιμοποιείται για την αποθήκευση κυττάρων για μελλοντικές μελέτες και νέα πειράματα αλλά και για να υπάρχουν αποθέματα καθαρών κυτταρικών σειρών ακόμα και αν συμβεί κάποιο ατύχημα ή μόλυνση. Η διαδικασία αρχικά είναι ίδια με αυτή της θρυψινοποίησης. Το ίζημα των κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο FBS. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε cryotubes με αναλογία FBS:DMSO, 9:1. Η φλάσκα ανακινείται και αποθηκεύεται στους -80°C όσο πιο γρήγορα γίνεται προκειμένου το διάλυμα DMSO να μην προφτάσει να εκδηλώσει την τοξικότητά του στα κύτταρα.

➤ Κρυοπροστατευτικά διαλύματα κυττάρων

i) 10% Διαλύματος DMSO (0,1ml)

Το DMSO αποτελεί μια οργανοφωσφορική ένωση με χημικό τύπο $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Το άχρωμο αυτό διάλυμα είναι ένας σημαντικός πολικός διαλύτης που έχει την ικανότητα να διαλύει τόσο πολικές όσο και μη πολικές ενώσεις και να αναμειγνύεται με ένα ευρύ φάσμα οργανικών διαλυτών, καθώς και το νερό. Το DMSO χρησιμοποιείται για την μείωση του σημείου πήξεως του μέσου, μειώνοντας το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου που μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο.

ii) 90% Διαλύματος Fetal Bovine Serum, FBS (0,9 ml)

Το FBS προστίθεται ώστε να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα και η ανάκτηση του μεγαλύτερου ποσοστού των κυττάρων μετά την απόψυξη καθώς περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τα κύτταρα.

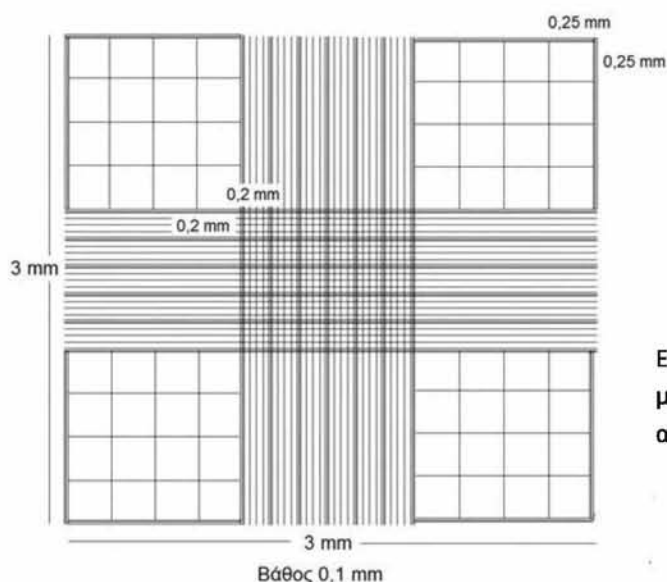
5.5.4 Μέτρηση κυττάρων HepG2 με πλάκα Neubauer

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer). Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια διαβαθμισμένη αντικειμενοφόρος πλάκα, που περιέχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες, λείες επιφάνειες. Σε κάθε μια από αυτές διακρίνεται μια διαγράμμιση σε μορφή τετραγωνισμένου πλέγματος, το οποίο αποτελείται από 16 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (συνεπάγεται ότι το εμβαδόν του τετραγώνου είναι 1mm^2). Το κάθε τετράγωνο εμφανίζει διαβαθμίσεις (χωρίζεται σε μικρότερα τετράγωνα) που εξυπηρετούν την ευκολότερη μέτρηση των κυττάρων.



Εικόνα 12 :Πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο)

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται μετά τη θρυψινοποίηση. Αρχικά, το αιμοκυτταρόμετρο αποστειρώνεται με 70 % αιθανόλη. Αμέσως μόλις επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση, μεταφέρεται μία μικρή ποσότητα κυττάρων σε ένα errendorf απ' όπου γίνεται λήψη 10μl με πιπέτα και μεταφορά στην κοίλη επιφάνειά της πλάκας Neubauer. Η πλάκα Neubauer τοποθετείται στο οπτικό μικροσκόπιο και μετράται ο συνολικός αριθμός κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων στα τεταρτημόρια αυτά $(a+b+c+d/4)$. Ο αριθμός που προκύπτει αντιστοιχεί στα 10μl, επομένως γίνεται αναγωγή στο 1ml. Τέλος γίνεται υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων που επιθυμούμε να έχουμε σε κάθε plate. Ο αριθμός αυτός διαιρείται με τον αριθμό των κυττάρων που είναι διαθέσιμα στην καλλιέργεια για να προκύψει η ποσότητα της αρχικής καλλιέργειας που θα χρειαστούμε για το πείραμα.



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της διαγράμμισης σε μορφή τετραγωνισμένου πλέγματος, το οποίο αποτελείται από 16 κύρια τετράγωνα

5.6 Προετοιμασία κυττάρων για το πείραμα ελέγχου δραστικότητας του ενζύμου GPb.

Για την εκτίμηση της δραστικότητας της GPb τα κύτταρα μεταφέρονται σε πιάτα καλλιέργειας 60mm τα οποία περιέχουν 1.8×10^6 κύτταρα ανά πιάτο. Μετά την προσκόλληση των κυττάρων στα τρυβλία και την επαρκή τους ανάπτυξη ώστε να καλύψουν το μεγαλύτερο τμήμα του ταπητίου των plates (24 ώρες) το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό απουσία ορού (serum free DMEM (w/o FBS) το οποίο περιείχε 10nM DEX, 25mM γλυκόζη, 10nM ινσουλίνη, και τα κύτταρα επωάζονται περαιτέρω 16h έτσι ώστε να παραχθεί γλυκογόνο λόγω περίσσειας γλυκόζης ως αποθηκευτική μορφή ενέργειας.

Μετά την 16ωρη επώαση, το παραπάνω θρεπτικό μέσω αντικαθίσταται με serum free (w/o FBS) θρεπτικό που περιέχει 5mM γλυκόζης και 10nM DEX (μέσο ανάπτυξης χαμηλό σε γλυκόζη). Υπό τις συνθήκες αυτές ενεργοποιείται η γλυκογονόλυση, μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου GPb, για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται για 3h παρουσία και απουσία (κύτταρα μάρτυρες, control) των ποσοτήτων των αναστολέων.

	1 ^η μέρα	2 ^η μέρα
Δεξαμεθαζόνη(DEX)	10nM	10nM
Ινσουλίνη	10nM	-
Γλυκόζη	25mM	5mM
Διάρκεια επώασης	16-18h	3h

Για τη έκπλυση και συλλογή των κυττάρων που έχουν επωαστεί με τους αναστολείς χρησιμοποιούμε το διάλυμα DMEM(low glucose χωρίς phenol red). Τα κύτταρα συλλέγονται προσεκτικά με τη βοήθεια ενός ειδικού πλαστικού ξύστρου (scraper). Η συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος πραγματοποιείται σε πλαστικά errendorfs τα οποία φυγοκεντρώνονται για 6min σε 1500rpm σε μικροφυγόκεντρο στους 4oC. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα φυλάσσεται στους -80⁰C μέχρι τη μέρα που θα πραγματοποιηθεί το πείραμα.

Κυτταρική λύση

Την ημέρα του πειράματος κάθε κυτταρικό εκχύλισμα επαναιωρείται σε 500μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer) που περιέχει 20 mM Hepes, 0,05% TritonX-100 και 1 mM PMSF και αφήνεται στον πάγο για 20min. Έπειτα ομογενοποιείται μέσω της συσκευής παραγωγής υπερήχων (sonicator) 4 φορές για 5sec(με 30sec μεσοδιάστημα) με σκοπό τη διάσπαση των μεμβρανών και τη λύση των κυττάρων. Το διάλυμα που παράγεται μετά τη λύση τους, φυγοκεντρείται για 15min στους 4oC σε 13000rpm σε μικροφυγόκεντρο. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο υπερκείμενο καθορίζεται με τη μέθοδο Bradford.

Αναλυτικές μέθοδοι

5.7 Ενζυμικός προσδιορισμός δραστηριότητας GPb

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη. Στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιούνται παρακάτω μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, δηλαδή την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο

ώστε να προκύψει γλυκογόνο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών από την G1P. Τα ιόντα αυτά μετρούνται φασματοφωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν με τη μέθοδο του ασκορβικού/μολυβδαινικού οξέος.

5.7.1 Εκτίμηση βέλτιστης ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες με κυτταρικά εκχυλίσματα χωρίς αναστολέα(control) προκειμένου να βρεθεί η κατάλληλη ποσότητα εκχυλίσματος που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα. Αναλυτικότερα στο υπερκείμενο που προκύπτει από την λύση των κυττάρων(5.6) προστίθεται συγκεκριμένος όγκος γλυκογόνου 1%. Από αυτό το διάλυμα μεταφέρεται x ποσότητα στο διάλυμα υποστρώματος που αποτελείται από 1-φωσφορική γλυκόζη (GIP) 20mM και H₂O. Οι ποσότητες που δοκιμάστηκαν είναι οι εξής : 36μl, 50μl, 100μl και 170μl.

Στη συνέχεια από το μίγμα που προκύπτει μεταφέρονται 40μl σε σωληνάκι που περιέχει 10μl SDS 1% ώστε να σταματήσει η αντίδραση λόγω μετουσίωσης της πρωτεΐνης. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C. Οι χρόνοι στους οποίους λαμβάναμε δείγμα για να σταματήσουμε την αντίδραση, μετά την έναρξη της ήταν: 5min, 10min, 15min και 20min.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, προστίθενται από 500 μl διάλυμα ασκορβικού οξέος- διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα για τον προσδιορισμό του φωσφόρου.

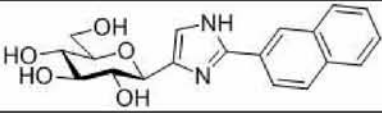
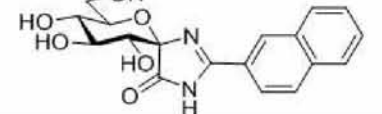
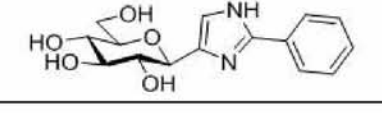
- Από τις παραπάνω δοκιμές καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η βέλτιστη ποσότητα εκχυλίσματος που θα χρησιμοποιήσουμε για τα επόμενα πειράματα είναι τα 100μl.

5.7.2 Μελέτες σε αναστολείς

Για να διερευνηθεί η αναστολή που προκαλούν οι ενώσεις χρησιμοποιώντας *ex vivo* σύστημα ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2 πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες αρχικά ως προς μια συγκέντρωση της κάθε ένωσης με σκοπό να διαπιστωθεί αν προκαλείται αναστολή για να ακολουθήσει στη συνέχεια IC50. Οι αναστολείς που μελετήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.

Η συγκέντρωση που μελετήθηκε για τους παρακάτω αναστολείς προέκυψε ως εξής:

- I. Για τους SzE 290 και SzK 377 χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 100 φορές μεγαλύτερη(μM) συγκριτικά με την Ki του κάθε αναστολέα στα *in vitro* πειράματα
- II. Για τον SzE 248 χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη (μM) συγκριτικά με την Ki του στα *in vitro* πειράματα.

Inhibitor	Structure	Ki (μM) in vitro	Συγκέντρωση που μελετήθηκε
SzE 290		3.18±0.14	318μM
SzK 377		1.72± 0.07	172μM
SzE 248		25.9±0.82	259μM

Πίνακας 2: Δομή και στοιχεία των αναστολέων που μελετήθηκαν.

Το διάλυμα που περιέχει το κυτταρικό εκχύλισμα και γλυκογόνο 1% τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 30°C και επώαστηκε για 15min. Τα τελευταία 5min τοποθετήσαμε στο υδατόλουτρο και το διάλυμα υποστρώματος(GIP 20mM και H₂O) ώστε να αποκτήσει την ίδια θερμοκρασία με αυτή του κυτταρικού εκχυλίσματος. Μετά το πέρας των 15 λεπτών μεταφέραμε 100μl από το εκχύλισμα στο διάλυμα υποστρώματος. Στη συνέχεια του πειράματος λαμβάναμε 40 μl από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5,10,15,20 min, και τα αποθέταμε σε 10 μl SDS 1 %. κάνοντας έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση.

Σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάσαμε και τρία δείγματα ελέγχου(control) χωρίς αναστολέα. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία για τον πρώτο αναστολέα τότε τοποθετήσαμε στο υδατόλουτρο το δεύτερο κυτταρικό εκχύλισμα, έγινε επώαση για 15min και η διαδικασία επαναλήφθηκε με τον ίδιο τρόπο και για τον τρίτο αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, προστίθενται από 500 μl διάλυμα ασκορβικού οξέος- διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα για τον προσδιορισμό του φωσφόρου.

Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαλυμένοι σε DMSO 100%. Οι υπολογισμοί των συγκεντρώσεων έγιναν με τέτοιο τρόπο ώστε η συγκέντρωση του DMSO στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων να είναι από 1:1000 έως 1:200(έως 0.5%)

- Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο ο αναστολέας SzK 377 είχε σημαντική ανασταλτική δράση συγκριτικά με τα control κύτταρα και για αυτό το λόγο προχωρήσαμε σε περαιτέρω μελέτη του για τον προσδιορισμό της IC₅₀ του.
- Επιπλέον μελετήσαμε και τον αναστολέα BC1-11(ανάλογο χρυσίνης) ο οποίος εμφανίζει υψηλή ανασταλτική ικανότητα στα in vitro πειράματα.

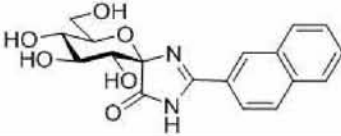
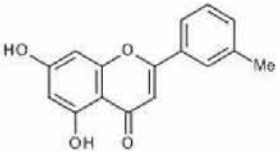
5.7.3 Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέων

Ο προσδιορισμός των σταθερών IC₅₀ προϋποθέτει την κινητική μελέτη του ενζύμου με διάφορες συγκεντρώσεις του αναστολέα για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P.

Πραγματοποιήθηκε IC₅₀ για τους εξής αναστολείς:

1. SzK 377 σε συγκεντρώσεις: 86μM, 172μM, 258μM, 344μM, 516μM
2. BC1-11 σε συγκεντρώσεις: 54.5μM, 109μM, 163.5μM, 218μM, 327μM

Οι 2 αναστολείς ήταν διαλυμένοι σε πυκνό DMSO(100%) και είχαν συγκέντρωση 100mM ο SzK 377 και 50mM ο BC1-11.

Inhibitor	Structure
SzK 377	
BC1-11	

Πίνακας 3 : Δομή των αναστολέων που μελετήθηκαν.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή της παραγράφου 5.7.2.

Παρασκευή διαλυμάτων αναφοράς

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC₅₀ του ενζύμου βασίζεται στο προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb, γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση φωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου αλλά είναι παρόντα στο μίγμα αντίδρασης ως ενδογενή φωσφορικά των κυτταρικών εκχυλισμάτων.

Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάστηκαν εις διπλούν και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος αυτών.

- Διάλυμα H₂O : 10 μL SDS 1 % (w/v)+ 40 μL dH₂O
- Διάλυμα G1P : 10 μL SDS 1 % (w/v)+ 31.1 μL dH₂O + 8.9 μL από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P(20mM)
- Διάλυμα φωσφορικών : 10 μL SDS 1 % (w/v)+ 30 μL dH₂O + 10 μL Pi 1 mM

5.7.4 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφορικών ιόντων

Το ανόργανο φωσφορικό σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία Zn^{2+} σε pH 5, το οποίο απορροφά ισχυρά την υπεριώδη ακτινοβολία. Μετά από αναγωγή με το ασκορβικό οξύ, παράγεται ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 850 nm. Απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων το χρωμοφόρο σύμπλοκο δεν παράγεται. Για το λόγο αυτό η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αντιδράσεων απελευθέρωσης ορθοφωσφορικών ιόντων, όπως για τον προσδιορισμό της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που μας ενδιαφέρει στα συγκεκριμένα πειράματα.

Η παρασκευή των διαλυμάτων έγινε ως εξής:

i) Μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίζεται στο 5.0 με πυκνό HCl και φυλάσσεται σε αδιαφανές μπουκάλι και μακριά από ηλιακή ακτινοβολία

ii) Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με πυκνό NaOH και φυλάσσεται σε αδιαφανές μπουκάλι. (Saheki, Takeda, & Shimazu, 1985)

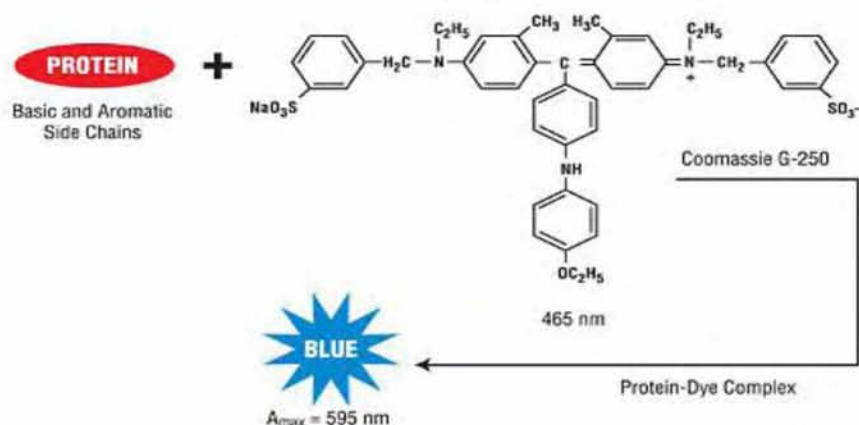
Πορεία:

Αφού τα δύο διαλύματα ετοιμάστηκαν, έγινε ανάμιξη του διαλύματος οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου με το διάλυμα ασκορβικού οξέος σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο. Το μίγμα αφέθηκε για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Στη συνέχεια προστέθηκε στα δείγματα κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος (500μl) και αυτά επωάστηκαν σε θερμοκρασία 30°C για άλλα 15 min στο υδατόλουτρο. Ο ανόργανος φώσφορος που υπάρχει σχηματίζει σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+}) το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ και παράγεται ένα χρωμοφόρο που έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Ταυτόχρονα παρασκευάστηκε και ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τον υπολογισμό της ποσότητας στο άγνωστο δείγμα. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα, από τις οποίες θα προκύψουν και αλλά πειραματικά δεδομένα για την δημιουργία της καμπύλης για τον υπολογισμό της IC50.

5.7.5 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Αυτό οδηγεί σε μια φασματική μετατόπιση από την κοκκινωπή / καφέ μορφή της

χρωστικής ουσίας (μέγιστη απορρόφηση στα 465 nm) στη μπλε μορφή της χρωστικής (μέγιστη απορρόφηση στα 610 nm). Η διαφορά μεταξύ των δύο μορφών της χρωστικής είναι μεγαλύτερη στα 595 nm, κι έτσι αυτό είναι το βέλτιστο μήκος κύματος για τη μέτρηση του μπλε χρώματος από το σύμπλοκο της χρωστικής με την πρωτεΐνη. Η ανάπτυξη του χρώματος στη συγκεκριμένη μέθοδο έχει συσχετιστεί με την παρουσία ορισμένων βασικών αμινοξέων (κυρίως αργινίνη, ιστιδίνη και λυσίνη) στην πρωτεΐνη. Ελεύθερα αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους δεν παράγουν χρώμα με τη χρήση του αντιδραστηρίου αυτού. Οι δεσμοί Van der Waals και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν, επίσης, στη σύνδεση της χρωστικής με τις πρωτεΐνες. Ο αριθμός των μορίων της χρωστικής που συνδέονται με κάθε μόριο πρωτεΐνης είναι σχεδόν ανάλογος με τον αριθμό των θετικών φορτίων που φέρει η πρωτεΐνη. Για τη χρήση της μεθόδου κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης. (Bradford, 1976)



Εικόνα 14: σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με την πρωτεΐνη.

Η μέθοδος Bradford παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- 1) είναι απλή, γιατί η μέτρηση γίνεται από ανάμειξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με ένα μόνο διάλυμα χρωστικής
- 2) είναι πολύ ευαίσθητη γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και 1 mg πρωτεΐνης
- 3) είναι πολύ γρήγορη
- 4) πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς να απαιτείται ειδικός εξοπλισμός.

Διαδικασία:

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη με την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Για την κατασκευή της καμπύλης αυτής, χρησιμοποιείται μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων

πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού γνωστής συγκέντρωσης. Τα διαλύματα αναδεύονται καλά με vortex και επωάζονται για 10-15min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (χρόνος επώασης 5-60min, χρονικό όριο ανάπτυξης χρώματος). Ακολούθως τα διαλύματα αναδεύονται ξανά με vortex και φασματοφωτομετρούνται στα 595nm. Στον πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA.

BSA 1mg/ml (μl)	dH ₂ O(μl)	Bradford 1x (μl)	A595nm(Au)
1	799	200	0,066
2	798	200	0,122
5	795	200	0,301
10	790	200	0,498
15	785	200	0,653
20	780	200	0,844
30	770	200	1,129

Με τις μετρήσεις των πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια του προγράμματος excel office, η οποία είναι της μορφής $y=ax + b$. Κάθε φωτομετρική μέτρηση κυτταρικού εκχυλίσματος αντιστοιχεί στην παράμετρο y της εξίσωσης και με τη βοήθεια αυτού βρίσκεται για κάθε δείγμα η παράμετρος x .

Η πρότυπη καμπύλη που προέκυψε από τις παραπάνω τιμές έχει εξίσωση $y=0,0365x+0,0831$.

5.7.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ενζυμικής κινητικής έγινε χρήση του προγράμματος GraFit 4.0. εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simpleweighting').

Η τιμή IC₅₀ προσδιορίζεται από την καμπύλη που προκύπτει από την απεικόνιση της δράσης ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα, παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης υποστρώματος.

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC₅₀ θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC₅₀ προκύπτει από το διάγραμμα %αναστολή=f([I]). Από την τιμή της IC₅₀ προκύπτει κατά προσέγγιση η

τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί όπως και η K_m έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

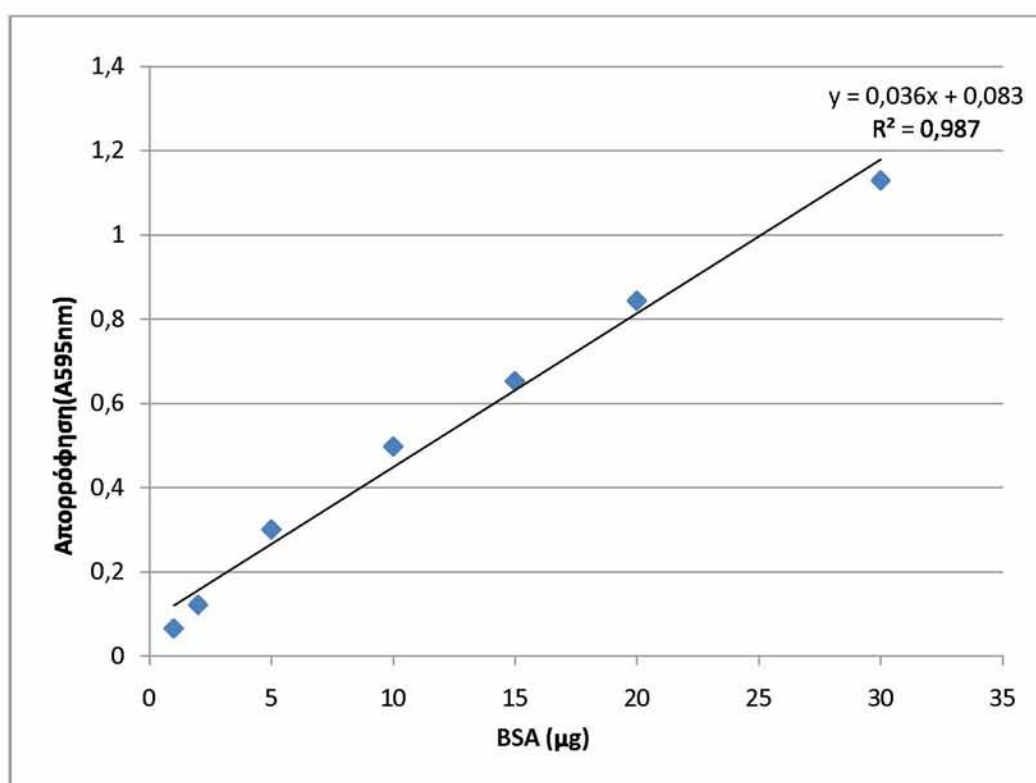
Όπου: $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος ως προς το οποίο εξετάζεται η GPb, δηλαδή η συγκέντρωση της Glc-1-P. (*Leatherbarrow RJ, 1998*)

6.Αποτελέσματα-Συζήτηση

6.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τη μέθοδο Bradford

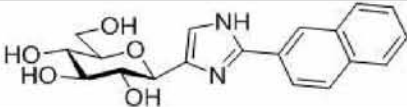
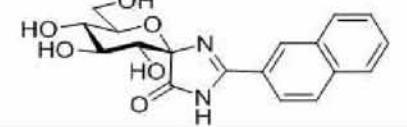
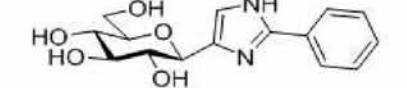
Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την ποσότητα πρωτεΐνης αλβουμίνης από ορό βοοειδών (BSA) στο δείγμα αντίδρασης μετρώντας την οπτική απορρόφηση δειγμάτων γνωστής ποσότητας πρωτεΐνης. Η πρότυπη καμπύλη έχει εξίσωση $y = 0,036x + 0,083$ και παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1.

Με τη χρήση της εξίσωσης που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο κυτταρικό εκχύλισμα.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Bradford

6.2 Μελέτη αναστολέων

Inhibitor	Structure	K _i (μM) in vitro	Συγκέντρωση που μελετήθηκε
SzE 290		3.18±0.14	318μM
SzK 377		1.72± 0.07	172μM
SzE 248		25.9±0.82	259μM

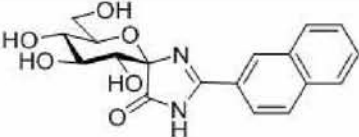
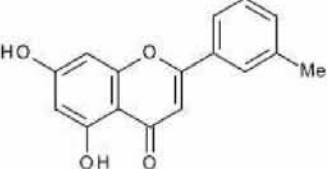
Πίνακας 4: Δομή και στοιχεία των αναστολέων που μελετήθηκαν.

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δοκιμάζοντας μια συγκέντρωση του κάθε αναστολέα προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα : Ο SzE 290 εμφάνισε μέτρια αναστολή σε συγκέντρωση 318μM ενώ ο SzE 248 σχεδόν καμία αναστολή συγκριτικά με τα κύτταρα control. Οι 2 αυτοί αναστολείς είναι ανάλογα D- γλυκόζης με ένα ιμιδαζόλιο που συνδέει τη γλυκοπυρανόζη με ένα δακτύλιο ναφθαλενίου για τον SzE 290 και βενζολίου για τον SzE 248. Η μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα του SzE 290 ίσως να οφείλεται στους περισσότερους δεσμούς Van der Waals (Kyriakis unpublished results) που δημιουργούνται λόγω του επιπλέον δακτυλίου του. Ο SzK 377 είχε τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση συγκριτικά με τους άλλους 2 αναστολείς στη συγκέντρωση που μελετήθηκε και γι'αυτό δοκιμάστηκε σε περισσότερες συγκεντρώσεις για τον προσδιορισμό της σταθερής IC₅₀.

6.3 Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέων

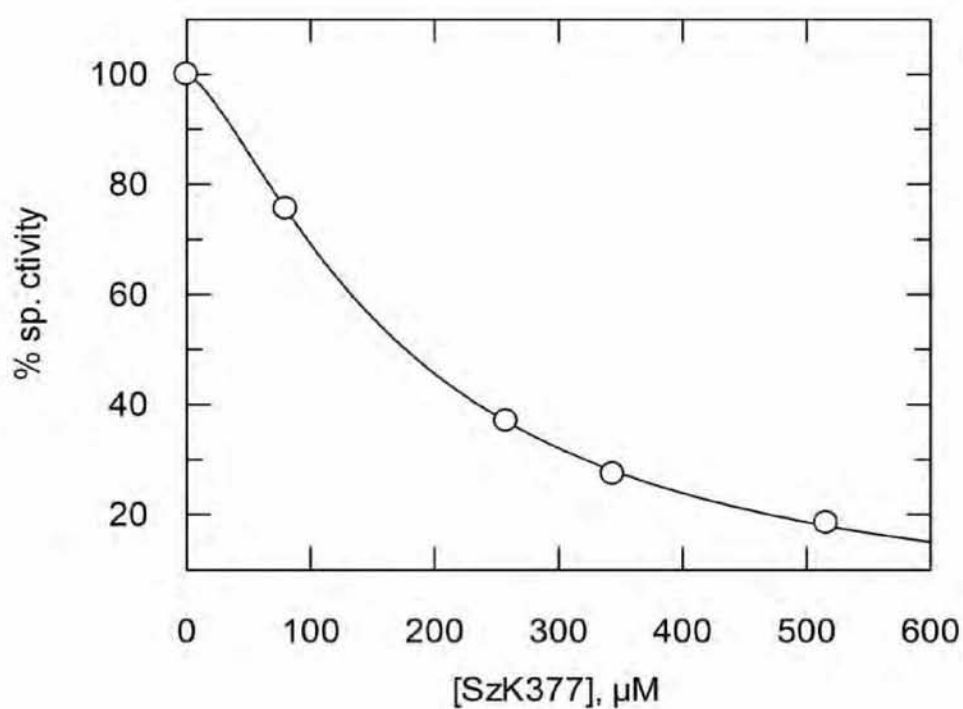
Μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας να παρεμποδίζει τη βιολογική ή βιοχημική δράση, αποτελεί η μέση ανασταλτική συγκέντρωση IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration), η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση του αναστολέα με την οποία μειώνεται κατά 50% η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης (50% IC, ή IC₅₀). Οι τιμές της παραμέτρου αυτής εξαρτώνται από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες έχουν λάβει χώρα οι μετρήσεις, καθώς και από το είδος του αναστολέα. Κατά κανόνα, όσο υψηλότερη είναι η IC₅₀, τόσο χαμηλότερη θα είναι η ανταγωνιστική δραστηριότητα. Συνήθως χρησιμοποιείται ως ένα μέτρο της ισχύος του φαρμάκου ανταγωνιστή σε φαρμακολογική έρευνα. (Zifa A. et al 2007)

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της IC₅₀ προέκυψαν με βάση την K_i(μM) των αναστολέων στα in vitro πειράματα (50,100,150,200 και 300 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση από την K_i).

Inhibitor	Structure	K _i (μM) in vitro	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν	IC ₅₀ (μM)
SzK 377		1.72 ± 0.07	86 μM, 172 μM, 258 μM 344 μM, 516 μM	176,7 ± 1,7
BC1-11		1.09 ± 0.038	54.5 μM, 109 μM, 163.5 μM, 218 μM, 327 μM	70,03 ± 2,5

Πίνακας 5 : Δομές και σταθερές των αναστολέων που μελετήθηκαν

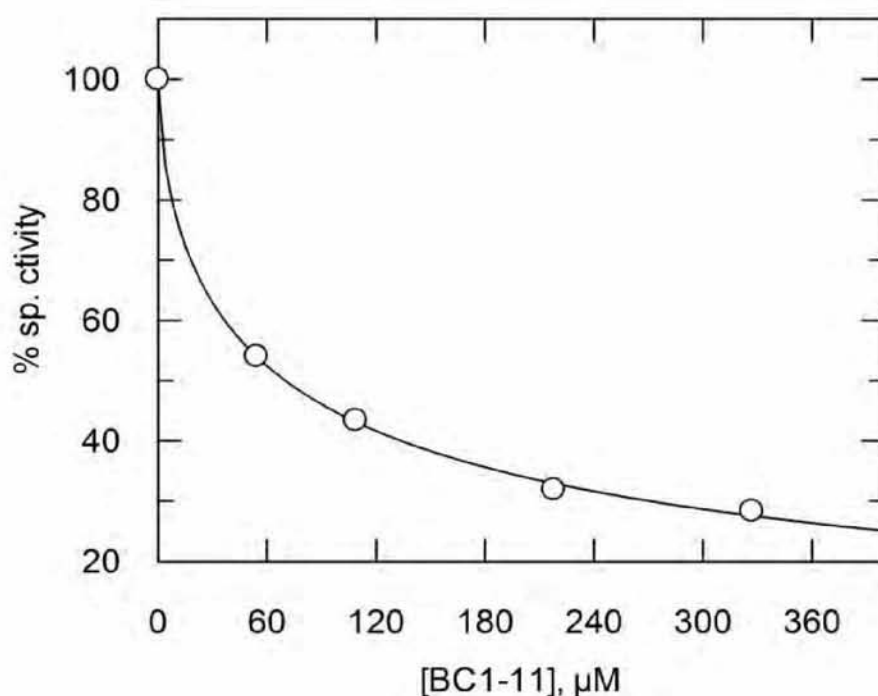
I. SzK 377



Εικόνα 15: Καμπύλη της δραστηριότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του SzK377 και υπολογισμός της IC₅₀. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που απεικονίζονται στο διάγραμμα είναι οι εξής: 86 μM, 258 μM, 344 μM, 516 μM.

Parameter	Value	Std. Error
IC 50 (μM)	176,7	1,7
Slope factor	1,4	0,01

II. BC1-11



Εικόνα 16 : Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του BC1-11 και υπολογισμός της IC50. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που απεικονίζονται στο διάγραμμα είναι οι εξής: 54.5 μM , 109 μM , 218 μM , 327 μM .

Parameter	Value	Std. Error
IC 50 (μM)	70,03	2,5
Slope factor	0,6	0,02

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή υπογλυκαιμική δράση αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2. Η μελέτη έγινε σε εκχυλίσματα τα οποία έχουν εξεταστεί σε προηγούμενες μελέτες σε *in vitro* πειράματα και έχουν δείξει σημαντική αναστολή της ηπατικής GPb. Συγκεκριμένα έγινε προσδιορισμός των σταθερών IC50 για τους αναστολείς SzK 377 και BC1-11. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένοι αναστολείς έχουν ανασταλτική ικανότητα σε κυτταρικό επίπεδο και αξίζει να μελετηθούν περαιτέρω σε διάφορες συγκεντρώσεις προκειμένου να προχωρήσουν τα πειράματα αυτά και σε κλινικό στάδιο.

Ο αναστολέας SzK 377 αποτελεί ένα ανάλογο D-γλυκόζης που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ο αναστολέας BC1-11 αποτελεί ένα ανάλογο χρυσίνης. Η χρυσίνη ανήκει στα флаβονοειδή και συγκεκριμένα στις флаβόνες με τον γενικό της τύπο να περιλαμβάνει δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται συνήθως με οξυγονούχο ετεροκυκλικό δακτύλιο. Η ανάλυση της δομής της έδειξε ότι η χρυσίνη συνδέεται στο κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης όπου επίσης συνδέεται η καφεΐνη, ένας φυσικός αναστολέας του ενζύμου. Πολλά παράγωγα φυσικών флаβονοειδών όπως флаβόνες, флаβανόλες, κατεχίνες και ανθοκυανίνες έχουν διερευνηθεί ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Αυτά τα флаβονοειδή είναι παρόντα σε λαχανικά, φρούτα, τσάι και κρασί και συχνά καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες στην καθημερινή διατροφή. Η κατανάλωση τους είναι πιθανό να συμβάλλει στην παρεμπόδιση της εξέλιξης της υπεργλυκαιμίας και των επιπλοκών του διαβήτη τύπου II. Ωστόσο, δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο δράσης τους στην GP. (Tsitsanou et al., 2013)

Παράρτημα

1. Μελέτη πρόσδεσης αναστολέων

Είναι γνωστό ότι μόνο μία μικρή περιοχή (ενεργός περιοχή) του συνολικού ενζυμικού μορίου εμπλέκεται άμεσα στην καταλυτική διεργασία ενώ κύριος ρόλος του υπόλοιπου μορίου είναι να διατηρεί την ενεργό περιοχή σε στερεοδιατάξεις καταλυτικά δραστικές, ώστε να δεσμεύει και να δρα στα υποστρώματα. Συνέπεια αυτού είναι τα ένζυμα, στην πράξη, να εμφανίζουν δύο άριστες (βέλτιστες) συνθήκες. Μία που αφορά στη δομική σταθερότητα του μορίου γενικά, και μια που αφορά άμεσα στην καταλυτική ικανότητα (δραστικότητα) και αντικατοπτρίζει την κατάσταση στην ενεργό περιοχή. (Georgatsos I. G et al ,2001)

Η δραστικότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Ως αναστολείς θεωρούνται ουσίες οι οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, έχοντας την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο και να παρεμποδίζουν τη δράση του. Οι αναστολείς λειτουργούν εκλεκτικά, αλληλεπιδρώντας με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης επί του ενζυμικού μορίου. (Georgatsos I. G et al ,2001)

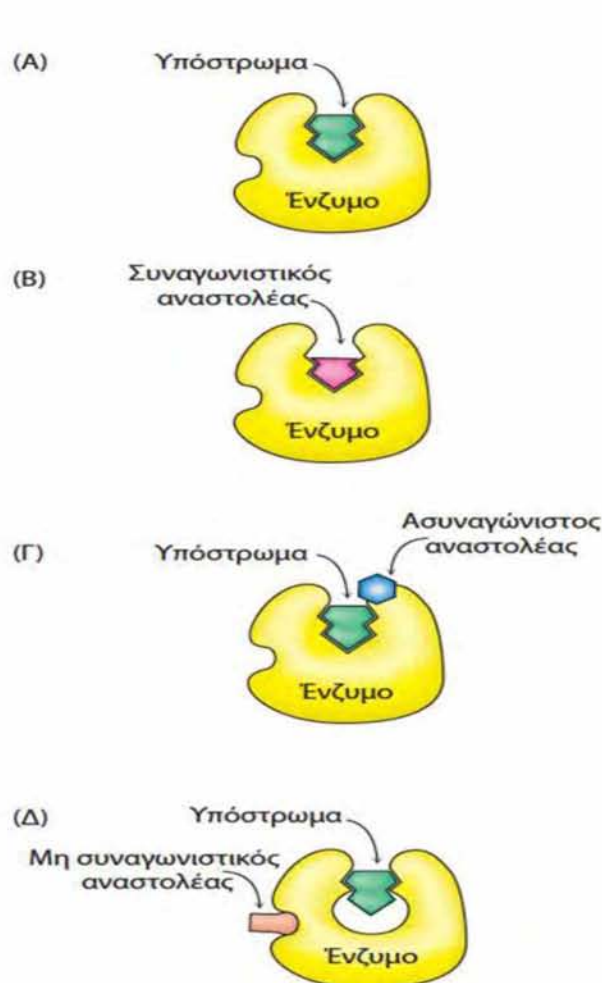
Με βάση την κινητική, οι αναστολείς διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη αντιστρεπτούς. Αντιστρεπτός είναι ο αναστολέας που μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα και όταν αφαιρεθεί το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστικότητά του. Αντίθετα ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο του ενεργού κέντρου παρεμποδίζοντας τη δέσμευση του υποστρώματος ή εξουδετερώνοντας κάποια πλάγια αλυσίδα που συμμετέχει στην καταλυτική διαδικασία. Ο αναστολέας σε αυτή την περίπτωση συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα. Μερικοί μη αντιστρεπτοί αναστολείς είναι πολύ σπουδαία φάρμακα. (Georgatsos I. G et al ,2001)

Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής, π.χ. συναγωνιστική, ανταγωνιστική, μικτή, μη συναγωνιστική, μερική, υποστρώματος, προϊόντος και αλλοστερική. Όλες διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης που βασίζεται στην αρχική αντίδραση.

Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδέσει υπόστρωμα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI) αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ως εκ τούτου το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση του αναστολέα, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του

υποστρώματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα για το ενεργό κέντρο. Στη συναγωνιστική αναστολή η V_{max} δεν επηρεάζεται, αλλά η φαινομενική K_M αυξάνεται (K_M^{app}). (Stryer L. et al., 2012)

Στην ασυναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας προσδένεται μόνο στο σύμπλοκο ενζύμου- υποστρώματος. Η περιοχή πρόσδεσης του ασυναγωνιστικού αναστολέα δημιουργείται κατά την αλληλεπίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα και η αναστολή δεν μπορεί να υπερνικηθεί με την προσθήκη περισσότερου υποστρώματος. Σε αυτόν τον τύπο αναστολής η V_{max} και η K_M ελαττώνονται. (Stryer L. et al., 2012)



Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στην περίπτωση αυτή η K_M παραμένει σταθερή ενώ η V_{max} μειώνεται. (Stryer L. et al., 2012)

Μια πιο περίπλοκη αναστολή, η οποία χαρακτηρίζεται ως μεικτή αναστολή, παράγεται όταν ένας αναστολέας επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος μεταβάλλοντας παράλληλα και τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου. Αποτέλεσμα αυτού είναι να μεταβάλλονται τόσο η K_M όσο και η V_{max} . Η K_M μπορεί να αυξηθεί ή να ελαττωθεί από τον αναστολέα, ενώ η V_{max} πάντα θα ελαττώνεται. (Georgatsos I. G et al ,2001)

Εικόνα 17: Διάκριση μεταξύ αναστολέων (Stryer L. et al., 2012)

2. Διαλύματα

1. PMSF 0.1M: Για την παρασκευή 2 mL PMSF 0.1M διαλύονται 0.034 gr PMSF σε 2 mL ισοπροπανόλης.
2. BSA: Για να έχω BSA 10mg/ml διαλύω 0.1gr σε 10ml H₂O.
3. G1P 20mM. Για την παρασκευή του διαλύματος G1P αρχικά έπρεπε να παρασκευαστούν δύο ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία περιείχαν τα παρακάτω:
 - Ρυθμιστικό διάλυμα 1: Ιμιδαζόλιο 200mM, KCl 400mM, DTT 4mM, EDTA 4mM, pH 6.8
 - Ρυθμιστικό διάλυμα 2: Ιμιδαζόλιο 135mM, KCl 270mM, DTT 2.7mM, EDTA 2.7mM, pH 6.8

Από το πυκνό διάλυμα G1P με συγκέντρωση 400mM παρασκευάστηκε G1P με συγκέντρωση 90mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα 1 και απιονισμένο νερό (dH₂O) σύμφωνα με τις κατάλληλες αναλογίες ώστε τελικά το διάλυμα να περιέχει ιμιδαζόλιο 135mM, KCl 270mM, DTT 2.7mM, EDTA 2.7mM, pH 6.8. Πιο συγκεκριμένα: G1P 90mM: 225μl G1P 400mM + 675μl ρυθμιστικό διάλυμα 1 + 100μl dH₂O

Η συγκέντρωση G1P που χρησιμοποιήθηκε στις κινητικές μελέτες(20mM) προήλθε με αραίωση από το διάλυμα G1P με συγκέντρωση 90mM. Σε αυτή την περίπτωση η αραίωση έγινε με το ρυθμιστικό διάλυμα 2.

Βιβλιογραφία

- Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., & Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical*, 5, 85–100.
- Barford, D., Hu, S. H., & Johnson, L. N. (1991). Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *Journal of Molecular Biology*, 218(1), 233–260.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bollen, M., Keppens, S., & Stalmans, W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *The Biochemical Journal*, 336 (Pt 1), 19–31.
- Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G. Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene* 2013 518(2):335-45.
- Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)*, 367(9513), 847–858.
- Georgatsos I. G. , Gioupsanis T. A., Kiriakidis D. **Ενζυμολογία: Κεφάλαιο 11-12, Ζήτη 2001**
- Hampson LJ, Arden C, Agius L, Ganotidis M, Kosmopoulou MN, Tiraidis C, Elemes Y, SakarellosC, Leonidas DD, Oikonomakos NG, Bioactivity of glycogen phosphorylase inhibitors that bind to the purine nucleoside site, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [01 Dec 2006, 14(23):7835-7845]
- Hayes, J. M., Kantsadi, A. L., & Leonidas, D. D. (2014). Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochemistry Reviews*, 13(2), 471–498.
- Johnson, L. N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 627–641
- Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet (London, England)*, 383(9922), 1068–1083.
- Karlson P., Doenecke D. J. Koolman, **Βιοχημεία 14^η έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2005**
- Katzung Bertram , **Βασική και κλινική φαρμακολογία, εκδόσεις Πασχαλίδης 2009**

- Kyriakis, E., Stravodimos, G. A., Kantsadi, A. L., Chatzileontiadou, D. S. M., Skamnaki, V. T., & Leonidas, D. D. (2015). Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b. *FEBS Letters*, 589(15), 1787–1794.
- Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998
- Livanova N. B., Chebotareva N. A., Eronina T. B., and Kurganov B. I., Pyridoxal 5'-Phosphate as a Catalytic and Conformational Cofactor of Muscle Glycogen Phosphorylase b, *Biochemistry (Moscow)* (2002), Vol. 67, No. 10, 2002, pp. 1089-1098
- Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., (1963), Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329.
- Newgard, C. B., Fletterick, R. J., Anderson, L. A., & Lebo, R. V. (1987). The polymorphic locus for glycogen storage disease VI (liver glycogen phosphorylase) maps to chromosome 14, *Am. J. Hum. Genet.* 40 (4) 351–364
- Rath VL, Ammirati M, Danley DE, Ekstrom JL, Gibbs EM, Hynes TR, Mathiowetz AM, McPherson RK, Olson TV, Treadway JL, Hoover DJ. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site , *Chem Biol.* 2000 Sep;7(9):677-82.
- Rath, V. L., Ammirati, M., LeMotte, P. K., Fennell, K. F., Mansour, M. N., Danley, D. E., ... Pandit, J. (2000). Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core. *Molecular Cell*, 6(1), 139–148.
- Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D., & Tagliabracci, V. S. (2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochemical Journal*, 441(3), 763–787
- Saheki, S., Takeda, A., & Shimazu, T. (1985). Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Analytical Biochemistry*, 148(2), 277–281
- Skamnaki V.T., Kantsadi A.L., Chatzileontiadou D.S.M., Stravodimos G., Leonidas D.D. Glycogen metabolism enzymes as molecular targets for drug developments. 2013 by Nova Science Publishers, Inc.
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet (London, England)*, 365(9467), 1333–1346.

- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL,. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012
- Treadway, J. L., Mendys, P., & Hoover, D. J. (2001). Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 10(3), 439–454.
- Tsitsanou, K. E., Hayes, J. M., Keramioti, M., Mamais, M., Oikonomakos, N. G., Kato, A., ... Zographos, S. E. (2013). Sourcing the affinity of flavonoids for the glycogen phosphorylase inhibitor site via crystallography, kinetics and QM/MM-PBSA binding studies: comparison of chrysin and flavopiridol. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, 14–27.
- Zifa A., Kouretas D., Balatsos N. , Στοιχεία Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Κεφάλαιο 4, σελίδα 116-118, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Θεσσαλίας 2007
- Zois, C. E., & Harris, A. L. (2016). Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *Journal of Molecular Medicine*, 94(2), 137–154